

제
농
축
2
0
1
7
-
7
4
호

닭

주
요

호
흡
기
질
병

(
뉴
캐
슬
병
,
닭
전
염
성
기
관
지
염
등
)

표
준

모
니
터
링

기
술
개
발

2
0
2
0

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개()발간등록번호()

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003142-01

닭 주요 호흡기질병 (뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염 등) 표준
모니터링 기술개발

최종보고서

2020.02.14.

주관연구기관 / (주)메디안디노스틱
협동연구기관 / (주)카브
협동연구기관 / 바이오엔텍
위탁연구기관 / 건국대학교 산학협력단

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “닭 주요 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염등) 표준 모니터링 기술 개발”(개발기간 : 2017. 04. 01 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 02. 14.

주관연구기관명 : (주)메디안디노스틱 (대표자) 오 진 식 (인)

협동연구기관명 : (주)카브 (대표자) 송 창 선 (인)

: 바이오엔텍 (대표자) 김 재 훈 (인)

위탁연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)

주관연구책임자 : 정 광 면

협동연구책임자 : 윤 하 나 / 김 재 훈

위탁연구책임자 : 이 상 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호		해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 04. 01 - 2019. 12. 31	단 계 구 분	(3) / (3)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	닭 주요 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염 등) 표준 모니터링 기술 개발			
연구책임자	정 광 면	해당단계 참여연구원 수	총: 21명 내부: 14명 외부: 7명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,020천원 계: 400,020천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 21명 내부: 14명 외부: 7명	총 연구개발비	정부: 825,000천원 민간: 275,040천원 계: 1,100,040천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메디안디노스틱			참여기업명 (주)카브 바이오엔텍	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 건국대학교 산학협력단			연구책임자: 이 상 원	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<p>요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 진단, 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 개발 2. 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(뉴모바이러스, 닭전염성기관지염 바이러스)의 모니터링 시스템 개발 및 피해 현황 조사 3. 닭 전염성기관지염(IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시 	<p>보고서 면수</p>
--	---------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>주요 닭 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염, 닭 뉴모바이러스) 표준 모니터링 기술 개발 - 모니터링 기술 확립을 통한 질병 발생현황을 명확히 파악하고, 방역에 도움을 주고 양계 산업의 경제적 피해 최소화</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 진단 ELISA kit 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 전세계적으로 유행하는 신규 QX-type에 대한 진단이 가능한 ELISA kit 개발 ○ 뉴캐슬병(ND) 진단 ELISA kit 민감도 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 기존 ELISA kit에서 검출이 어려운 국내 백신주에 대한 민감도 개선 ○ 육계, 산란계농장 닭 뉴모바이러스, 닭 전염성기관지염 바이러스 모니터링 기법 개발 및 피해 현황 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 육계, 산란계 농장에 대한 닭 뉴모바이러스, 닭 전염성기관지염 바이러스에 대한 모니터링 시스템 개발 (항원분리배양법 - Realtime PCR간의 비교) - 육계, 산란계 농장에 대한 주요 호흡기질병 발생현황 조사 ○ 뉴캐슬병(ND), 닭 전염성기관지염(IB) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시 <ul style="list-style-type: none"> - 시험, 현장 시료에 대한 시판 ELISA 제품별 항체역가 검사 - IB, ND 생독백신의 접종 방법별 주령에 따른 ELISA 항체역가 표준안 제시 - IB, ND 생독백신의 종류에 따른 ELISA 항체역가 표준안 제시 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 발생현황 파악이 미비한 닭 호흡기질병의 주기적인 예찰을 통하여 질병 전파·발생을 효과적으로 차단 ○ 항체검사 표준화로 각 방역주체의 질병 발생 파악 용이 ○ 질병발생 비율 감소, 신규 발생에 대한 양계농가 경제적 피해 최소화 및 경제 활동 안정화 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>닭</p>	<p>항체검사</p>	<p>닭전염성기관지염</p>	<p>뉴캐슬병</p>	<p>닭뉴모바이러스감염증</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Chicken</p>	<p>Serology</p>	<p>Infectious Bronchitis</p>	<p>NewCastle Disease</p>	<p>avian Metapneumo Virus</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구수행 내용 및 결과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	103
4. 연구결과의 활용 계획 등	106
붙임. 참고 문헌	108

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

구분	내용
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 진단, 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 개발 (1세부: (주)메디안디노스틱) <ul style="list-style-type: none"> - 전세계적으로 유행하는 신규 변이주에 대한 진단이 가능한 IB ELISA kit 개발 - 국내 판매중인 ND genotype들에 대한 진단 민감도 개선 ELISA kit 개발 ○ 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(뉴모바이러스, 닭전염성기관지염 바이러스)의 모니터링 시스템 개발 및 피해 현황 조사 (1협동: (주)카브) <ul style="list-style-type: none"> - 항원 검사 방법 설정 (항원배양방법과 realtime PCR간의 검출능 비교 평가) - 적정 검사시기에 제시 - 육계, 산란계/종계 농장을 대상으로 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 혈청 및 항원 진단 검사를 진행 ○ 닭 전염성기관지염(IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시 (2협동: 바이오엔텍) <ul style="list-style-type: none"> - 동물실험을 통한 IB, ND 생독백신의 종류별/접종방법별 목표 항체가 확인 - 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정 - 산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정 - 육계 산란계 대상 IB, ND 백신 후 항체역가 표준안 제시 및 항체진단 표준 검사법 제시 - 육계 - 산란계/종계 농장 대상 longitudinal study를 통한 주기별 바이러스 감염정도 모니터링 평가
세부목표	<p><제1세부: 신규 IBV 변이주 ELISA검사 kit 개발, 민감도 개선 ND ELISA kit 개발></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 신규 IBV 변이주 진단 ELISA kit 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 전세계적으로 널리 퍼져있는 IBV QX-type 혈청형에 대한 진단 ELISA kit 개발 - 변이주 감염 후 기존 ELISA kit와의 항체 검출능 비교 시험 2) 진단 민감도 개선 ND ELISA kit 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 백신주의 genotype들에 대한 민감도가 개선된 ELISA kit 개발 - HI test와의 비교 평가를 통하여 효능 검증

구분	내용
	<p><제1협동: 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(aMPV, IBV)의 모니터링 시스템 개발 및 피해현황 조사></p> <p>1) 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 모니터링 시스템 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 농장 별 주기적인 혈청검사를 통하여 가장 효율적인 혈청검사 방법, 주기 설정을 통한 SOP 개발 - 항원 진단이 어려운 바이러스로 realtime PCR, 항원 분리배양 등의 방법을 비교하여 최적의 모니터링 SOP 개발 <p>2) 산란계 육계 농장에 대한 주요 호흡기질병 발생 현황 조사 및 예방대책 수립 제시</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산란계, 육계농장 대상 시험농가를 3곳 이상 선정하여 전 주기에 걸친 longitudinal study를 진행하여 항원 및 혈청검사 - 협력 동물병원을 통한 시료 수집 및 호흡기질병 발생 현황 조사 - 수집된 질병 발생현황 및 개발된 모니터링시스템을 통하여 호흡기 질병 모니터링 SOP 작성 <p><제2협동 : IB, ND 생독백신 ELISA 검사 표준안 제시></p> <p>1) 동물실험을 통한 IB, ND 생독백신의 종류별 목표항체가 표준안 제시</p> <ul style="list-style-type: none"> - SPF 닭 대상으로 시판중인 IB, ND 생독백신 접종 후 목표 항체가 제시 <p>2) 본 과제에서 개발 ELISA kit를 이용한 IB, ND 생독백신 목표항체가 표준안 제시</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산란계, 육계농장 대상 시험농가를 선정하여 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 항체역가 측정 - 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정 - 산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정 - 산란계 산란 주기별 (산란전, peak, 후기 등) 항체가 표준 설정 - 육계 산란계 대상 IB, ND 백신 후 항체역가 표준안 제시 및 항체진단 표준 검사법 제시

1. 사회적 중요성

가. 조류의 경우 포유류와 달리 취약한 호흡기 기관을 갖고 있어 가금 전염성 질병 중 호흡기 질병이 차지하는 비중이 높음. 하지만 정부 R&D는 주로 고병원성 조류인플루엔자(HPAI)에 대한 연구가 대부분이고, 닭 전염성기관지염(IB), 닭 뉴모바이러스 감염증(aMPV), 뉴캐슬병(ND) 등 호흡기 바이러스성 질병에 대한 연구는 미비함.

분야	정부 총 투자		농식품부 투자		농식품부 투자율(%)	
	건 수	금액(억)	건 수	금액(억)	건 수	금액
진단예방기술	15	24.3	12	19.5	80.0	80.2
확산방지·사후관리 기술	11	9.9	11	9.9	100.0	100.0
동물약품개발기술	20	46.8	18	43.5	90.0	92.9

<표 1. 닭 호흡기질병 관련 투자현황(내역 사업별)>

(NTIS 검색조건 : 과제년도(2013~2016년), NTIS 검색어 : 닭, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병, 전염성기관지염, 뉴모바이러스)

- 나. 2013년부터 2016년까지 46건의 호흡기질병 관련 연구 중 조류인플루엔자(AI)관련 연구가 33건, IB관련 1건, ND관련 10건 등 인플루엔자 관련 연구가 절대 다수를 이루고 있어 그 외 호흡기질병에 대한 연구가 필요한 상황. 특히, 닭 뉴모바이러스 감염증의 경우 2004년 처음 국내에서 발병이 확인되어있지만, 관련 연구가 미진하여 전국적인 발생 현황 파악이 어려움.
- 다. 해당 호흡기질병의 경우 대부분 질병이 급성으로 진행되는 양상으로 정기적인 혈청, 항원 검사가 중요하고, 이에 대한 진단 키트는 시판되지 사용 중에 있음.
- 라. ND의 경우 항체가 수준에 따라 과태료 처분이 이뤄지고 있으나, 제조사별 항체 검사 키트에 따라 항체양성율이 달라 업계로 하여금 혼선 초래하는 상황임. IB는 5가지 이상의 다양한 혈청형이 국내에 공존하는 것으로 여겨지고 있으나, 다국적 회사의 항체 검사 키트의 경우 국내 발생 분리주와 혈청형이 맞지 않아 정확한 항체가 측정이 어려움. 국내 백신 적용이 잘 되었는지를 확인하는 기준이 없는 상황으로 백신 평가를 도와줄 혈청검사 표준안을 제시하는 것이 필요함.

2. 경제산업적 중요성

- 가. 뉴캐슬병(ND)의 경우 폐사율과 이환율이 높은 급성 전염병으로 제1종 법정전염병으로 관리되고 고병원성 ND의 경우 OIE에서 관리되어 발생시 수출입이 제한되는 질병임. 국내에서는 부화장 의무백신으로 2010년 이후 발생보고는 없으나 주변국가에서는 빈발하고 있는 상황. 폐사로 인한 직접적인 업계 손실을 일으키는 바이러스성 질병으로 정확한 항체검사를 통한 예방이 필요한 질병임.
- 나. 닭 전염성기관지염(IB), 닭 뉴모바이러스(aMPV)감염증의 경우 닭의 산란저하를 일으키는 질병이고, 특히 aMPV는 항원진단이 어려운 질병으로 정확한 진단을 위해선 주기적인 항

체 및 항원 모니터링이 필요함.

3. 기술적 중요성

- 가. 질병의 방제를 위해선 정확한 백신접종이 중요함. 그리고 백신이 잘 접종되어 있는지를 확인하기 위해서는 항체검사가 필수적임. 하지만 현재 백신의 접종경로/종류에 따라 항체양성율이 다양하기 때문에 진단에 혼선을 초래하고 진단 키트에 따라서도 결과가 다양한 상황. 이러한 다양한 조건을 조율할 표준화 연구가 필요함.
- 나. 한 다국적 업체의 진단키트의 경우 백신 종류 및 접종 경로에 따라 예상 항체가를 제시하고 있음. 하지만 국내에서 주로 문제되는 혈청형에 대한 정보는 포함하고 있지 않기 때문에 국내 실정에 적합한 매뉴얼 제시가 필요함.

TEST	VACCINE TYPE	MEAN TITER RANGE AT PROCESSING (35D- 45D)	VI Index	SUSPECT TITER INFECTION
IBV	live, 1x@ 01D (H120/mild Mass, Arkansas, DE072, MA5, IB primer, 4/91, IB Bird)	300 - 1 500	< 50	> 3 000 VI > 70
	live, 2x@ 01D (H120, MA5, IB Primer + 4/91, CR88, IB Bird)	500 - 2 500	< 60	> 3 000 VI > 70
	live, 2x (H120, MA5, IB Primer, MMark)	1 000 - 4 000	< 90	> 5 000 VI > 90
	live, 2x (H120/MA5 + 4/91 or H120 + CR88) < 13D	1 000 - 3 000	< 90	> 4 000 VI > 90
	live, 2x (H120/MA5 + 4/91 or H120 + CR88) > 13D	1 000 - 6 000	< 150	> 8 000 VI > 200

<그림 1> 다국적 진단키트업체에서 제시하는 백신 종류에 따른 항체가 기준

제 3 절. 연구개발 범위

가. 1차년도

① 개발 목표

- (1) 주관연구기관(메디안디노스틱) : 신규 IBV 변이주 및 ND genotype 별 항체 측정용 ELISA를 위한 원료물질 개발
- (2) 협동연구기관(카브) : aMPV, IBV 항원 진단 방법 표준안 제시
- (3) 협동연구기관(바이오엔텍) : 국내 ND, IB 생독백신에 대한 목표 항체가 제시 및 SOP 작성

② 개발 내용 및 범위

(1) 주관연구기관(메디안디노스틱)

- 기존 상용화 항체 진단키트(IBV & NDV)의 성능 평가 및 개선 방향 분석
 - 신장형 IBV 및 NDV 국내 백신주(Lasota, VII 등) 항혈청을 이용한 항체측정 성능평가
- 신규 IBV 변이주 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 개발
 - 신장형 IBV 등 신규 IBV 변이주의 항원성 및 중화 epitope 분석
 - *E.coli* 및 baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작 또는 불활화 virus 농축/정제 시스템 확립

- 진단용 원료물질의 characterization 및 성능평가
- NDV genotype 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 개발
- NDV (VII) 등 국내 백신주의 항원성 및 중화 epitope 분석
- *E.coli* 및 baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작 또는 불활화 virus 농축/정제 시스템 확립
- 진단용 원료물질의 characterization 및 성능평가

(2) 협동연구기관1(카브)

- 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭전염성기관지염(IBV) 항원 진단 표준안 제시
- 해당 두가지 바이러스는 모두 항원 진단이 어려운 바이러스로 시료에서의 항원 배양 후 진단하는 방법이 주로 사용됨. 하지만 항원 배양방법은 기간이 3일 이상 소요되고 인력이 많이 소모되는 등 빠른 대처를 하기에 적절하지 않은 방법임.
- 이를 개선하기 위한 Realtime PCR 방법 평가를 진행.
- SPF 닭에 실제 공격접종을 진행한 후 시기별 / 채취 방법별 시료를 나누어서 realtime PCR을 진행. 공격접종 시기에 따른 최적의 시료 채취방법을 설정하여 SOP에 포함하고자 함.

(3) 협동연구기관2(바이오엔텍)

- SPF닭 대상 국내 ND, IB 생독백신 시료에 대해 업체별 ELISA test 진행
- 국내 시판중인 ND, IB 생독백신에 대해 SPF 닭에서 주령별 백신 접종 평가를 진행하여 시판 ND ELISA kit의 항체 검출능 비교
- 현재 OIE(세계동물보건기구)에서 기준으로 삼고, 국제적으로 가장 많이 이용되는 HI test(ND)와 중화시험(IB)를 병행하여 ELISA titer와의 상관관계를 분석함
- 1일령 분무 또는 2-3주령 음수로 백신을 접종하여 3주 뒤 채혈을 진행. 채혈한 혈청의 ELISA test, HI test, 중화시험을 통한 항체 양성을 비교시험 진행
- 시판백신의 genotype, serotype에 따른 항체역가를 분석을 진행하여 각 type에 따른 항체 양성 역가를 제시하고자 함.
- 국내 IB, ND 생독백신 항체검사 SOP 작성
- 시험 결과를 바탕으로 IB, ND 백신을 평가하기 위한 SOP를 작성.
- ND 생백신의 부화장 분무가 의무화 되어있는 상황에서 ELISA kit별 백신역가를 제시하여 방역정책에 도움을 주고자 함.

나. 2차년도

① 개발 목표

- (1) 주관연구기관(메디안디노스틱) : 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 개발
- (2) 협동연구기관(카브) : 육계농장 aMPV, IBV 피해 현황 분석

(3) 협동연구기관(바이오엔텍) : 육계농장 IBV, NDV 항체가 추이 분석

② 개발 내용 및 범위

(1) 주관연구기관(메디안디노스틱)

○ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 개발

- 1차년도에 설정된 신장형 IBV 등 신규 IBV 변이주의 항원성 및 중화 epitope 분석 결과 및 *E.coli* 및 baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작 또는 불활화 virus 농축/정제 시스템을 이용한 진단 키트의 개발

(2) 협동연구기관1(카브)

○ 육계농장 aMPV, IBV 피해현황 분석

- 1차년도에 설정된 realtime PCR 방법, 바이러스 분리배양법을 활용하여 시험 농가의 aMPV, IBV 피해현황 분석 진행
- 시범 농가 3곳 이상 선정. 각 농가에서 한 계군 이상을 대상으로 하여 시기별 시료를 채취함.
- 각 시료를 대상으로 (주)카브에서는 realtime PCR방법을 이용한 진단과 병행하여 위탁기관(건국대학교)는 바이러스 분리배양법을 이용한 검출 진행
- 각 시료 검출 결과를 바탕으로 육계농장 대상 최적의 시료 채취시기, 최적의 바이러스 진단방법을 정리하고자 함.

(3) 협동연구기관2(바이오엔텍)

○ 육계농장 대상 IBV, NDV 항체가 추이 분석

- 1차년도에 설정된 IBV, NDV 항체검사 SOP를 이용하여 육계농장에 대한 항체가 평가 진행
- 시범 농가 3곳 이상 선정 진행. 각 농가에서 한 계군 이상을 대상으로 하여 1일령, 3주령 또는 출하전 시료를 채취함.
- 각 시료에 대해 시판 ELISA kit를 이용하여 항체가 분석을 진행.
- 1차년도에 작성한 표준 항체가와 대비하여 결과 분석
- SPF 대상 표준항체가와 시험결과 확인된 육계의 출하시 IB, ND 목표항체가, 균일도 제시

나. 3차년도

① 개발 목표

(1) 주관연구기관(메디안디노스틱) : 뉴캐슬병 항체진단 키트 개발

(2) 협동연구기관(카브) : 산란계/종계 농장 IBV, aMPV 피해현황 분석

(3) 협동연구기관(바이오엔텍) : 산란계/종계 농장 IBV, NDV 항체가 추이 분석

② 개발 내용 및 범위

(1) 주관연구기관(메디안디노스틱)

○ 뉴캐슬병 항체진단 키트 개발

- 1차년도 설정된 NDV (VII) 등 국내 백신주의 항원성 및 중화 epitope 분석 결과 및 *E.coli*, baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작 또는 불활화 virus 농축/정제 시스템을 이용한 항체진단 키트의 개발

(2) 협동연구기관1(카브)

○ 종계/산란계농장 aMPV, IBV 피해현황 분석

- 1차년도에 설정된 realtime PCR 방법, 바이러스 분리배양법을 활용하여 시험 농가의 aMPV, IBV 피해현황 분석 진행

- 시범 농가 3곳 이상 선정. 각 농가에서 한 계군을 대상으로 하여 시기별 시료를 채취함.

- 항원 진단이 어려운 바이러스이므로 되도록 시료채취는 높은 빈도로 진행할 예정. 최소 육성중 4회 이상, 산란중 3회 이상 진행.

- 각 시료를 대상으로 (주)카브에서는 realtime PCR방법을 이용한 진단과 병행하여 위탁기관 (건국대학교)는 바이러스 분리배양법을 이용한 검출 진행

- 각 시료 검출 결과를 바탕으로 종계/산란계농장 대상 최적의 시료 채취시기, 최적의 바이러스 진단방법을 정리하고자 함.

(3) 협동연구기관2(바이오엔텍)

○ 종계/산란계농장 대상 IBV, NDV 항체가 추이 분석

- 1차년도에 설정된 IBV, NDV 항체검사 SOP를 이용하여 종계/산란계농장에 대한 항체가 평가 진행

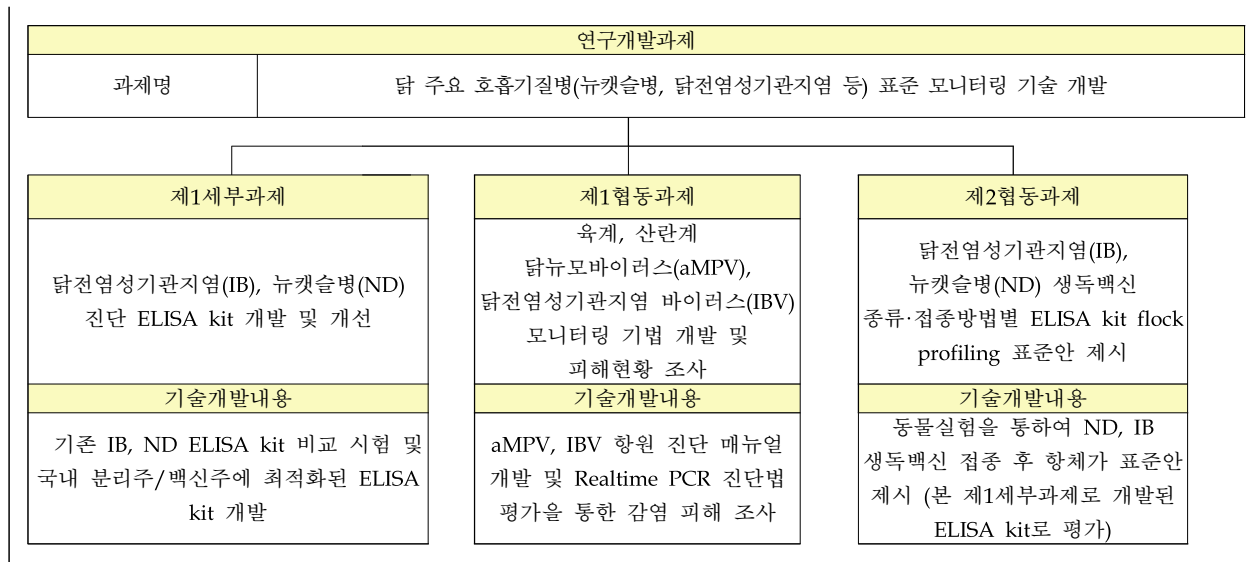
- 시범 농가 3곳 이상 선정 진행. 각 농가에서 한 계군을 대상으로 하여 시기별 시료를 채취함.

- 전 주기적인 혈청검사를 위해 시료 채취시기는 육성중 4회 이상, 산란중 3회 이상 진행.

- 각 시료에 대해 시판 ELISA kit를 이용하여 항체가 분석을 진행.

- 1차년도에 작성한 표준 항체가와 대비하여 결과 분석

- SPF 대상 표준항체가와 시험결과 확인된 종계/산란계의 주기별 IB, ND 목표항체가, 균일도 제시



제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연차별 연구수행 내용 및 결과

1. 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 진단 ELISA kit 개발 (주관연구기관 : (주)메디안디노스틱)

가. 신규 IBV 변이주 항체 측정용 ELISA를 위한 원료물질 개발

(1) 신규 IBV 변이주 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 개발

○ 본 연구에서는 신장형 IBV 등 신규 IBV 변이주의 항원성 및 중화 epitope 분석하고 IBV 변이주 (QX type)의 *E.coli* & Baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작과 IBV (QX type) 불활화항원 농축 및 정제 시스템 확립하였음. 확립 후 평가한 단백질은 아래와 같음.

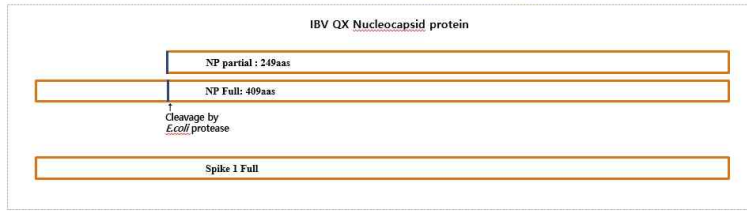
- IBV 변이주 (QX type) 불활화항원
- *E.coli* pET32a-NP full (BL21 codon plus, BL21 DE3), pET28a-NP full (BL21 DE3)
- *E.coli* NP partial (BL21 DE3, BL21 codon plus, AD494)
- *E.coli* NP truncated (A, B, C, D, E)
- Baculovirus Spike 1

(가) IBV 변이주 (QX type) 개발전략

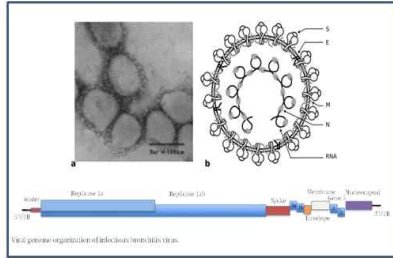
- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid, Spike)과 불활화항원을 제작하여 진단용 원료물질의 가능성을 확인하였고 IBV 변이주 (QX-type)의 항원성 및 중화 epitope 분석하여 진단용 원료물질의 가능성 테스트 하였음
- 평가결과 IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full과 truncated 항원이 진단용 원료물질의 가능성 확인하였으며, IBV 변이주 (QX-type)의 Nucleocapsid 단백질에 존재하는 특이적인 항원성이 있는 부위를 규명하기 위해 *E.coli* expression system을 이용한 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated을 제작하여 테스트 하였음

IBV (QX)

IBV QX recombinant protein design



진행상황



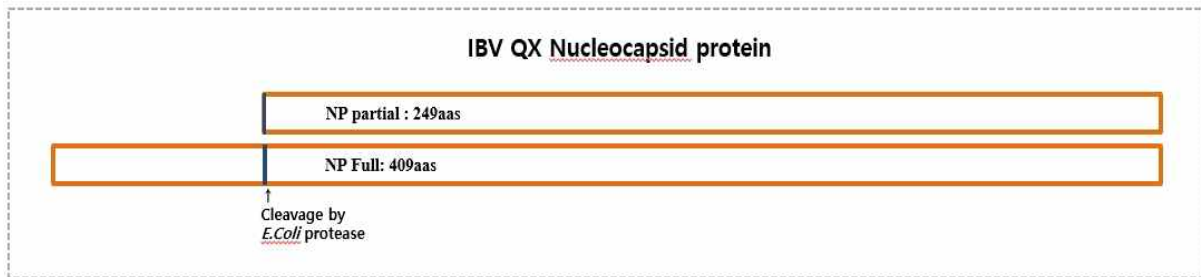
* Nucleocapsid protein (*E.coli* expression)

1. NP Full sequence
 - 1) pET28a: BL21 codon plus 발현&정제
 - 2) pET32a(Try): BL21 DE3, BL21 codon plus 발현&정제
2. NP partial sequence
 - 1) pET28a& pET32a Cloning중

* Spike protein (*Baculovirus* expression)

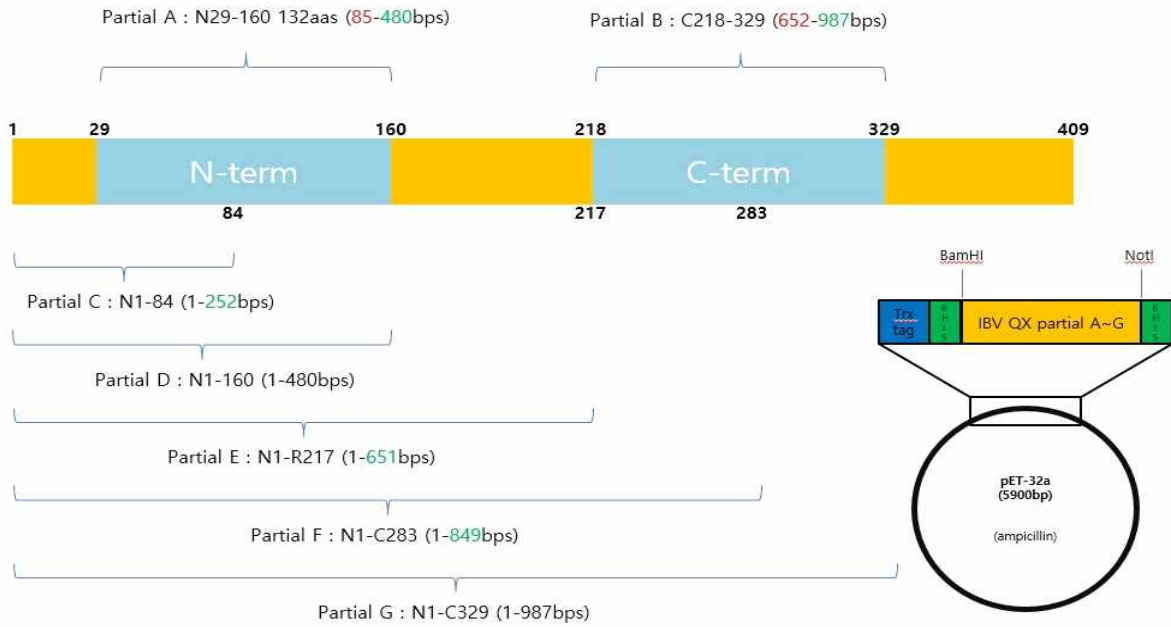
1. S1 gene fishing 완료
2. bacmid DNA 제작 예정

<그림 1> IBV 변이주 (QX-type) 개발 전략

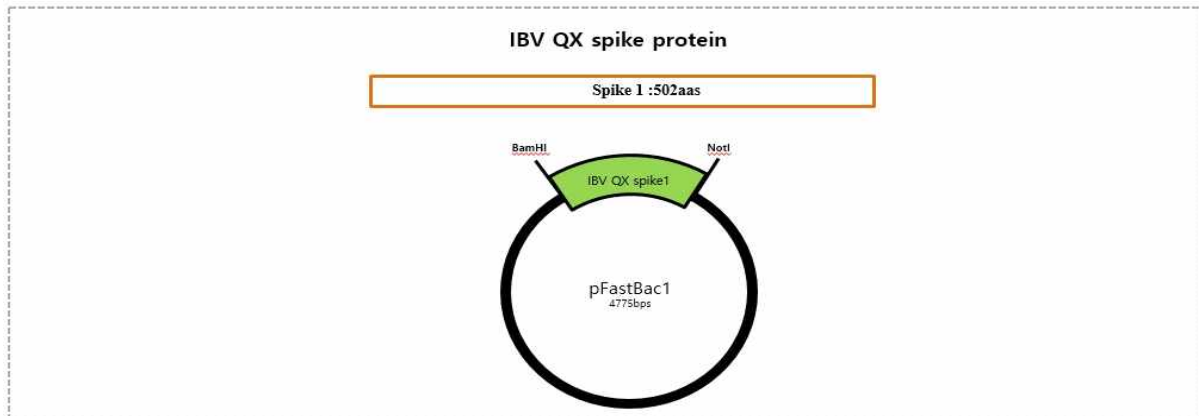


<그림 2> IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 모식도

IBV NP partial Cloning design (E.coli)



<그림 3> IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 모식도

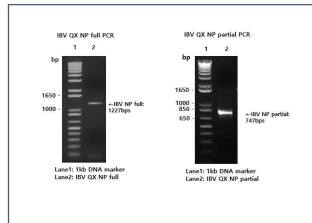


<그림 4> IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 모식도

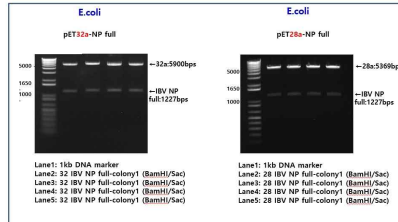
(나) IBV 변이주 (QX-type) 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 제작 (항원)

○ IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 제작

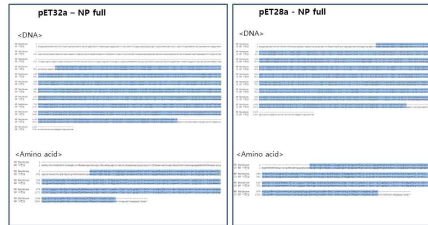
1. Gene 확보 (RNA preparation → cDNA synthesis → PCR)



2. Cloning (full)

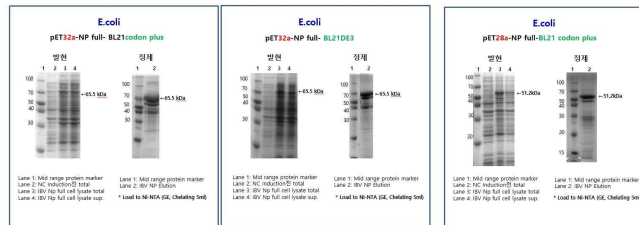


3. Sequencing



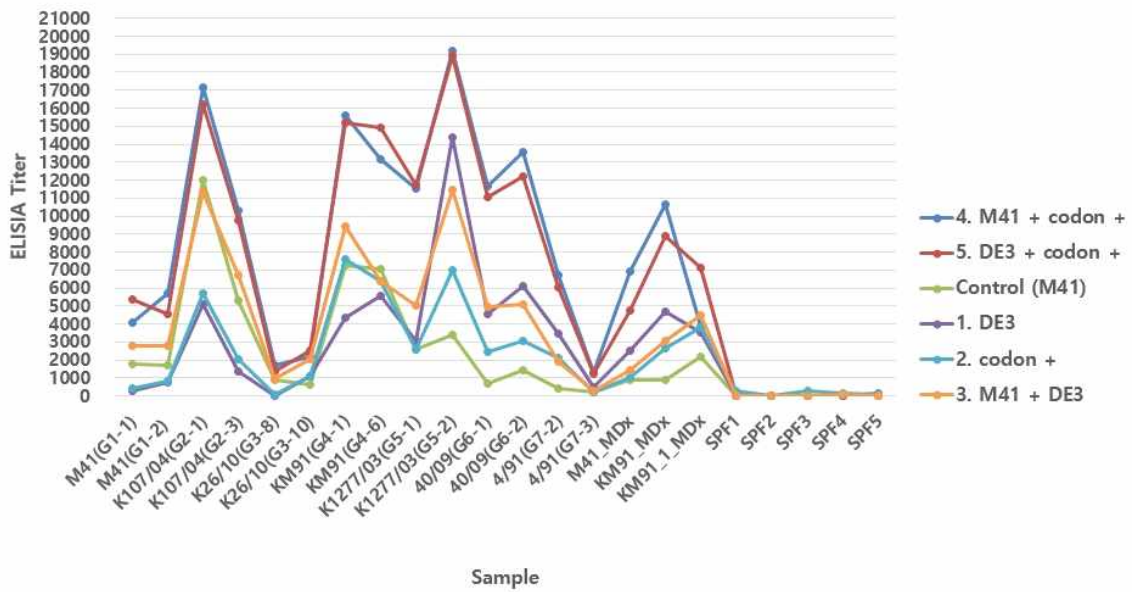
<그림 5> IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합 단백질 제작

4. Expression (full)



<그림 6> IBV 변이주 (QX type) *E. coli* 재조합단백질 발현 및 정제

IBV(QX) rec. NP based Ab ELISA (Indirect form)

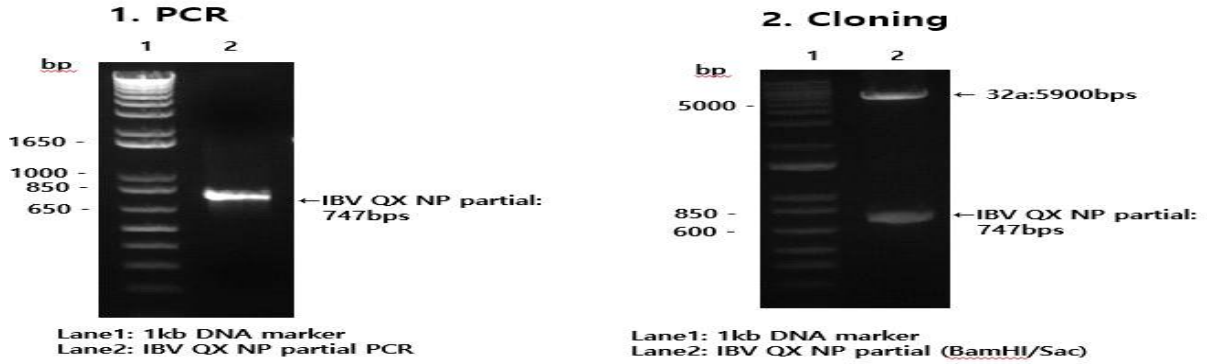


<그림 7> IBV 변이주 (QX type) *E. coli* 재조합단백질 반응성 분석

- IBV 변이주 (QX type)의 *E. coli* expression system을 이용한 재조합단백질의 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과 pET32a-NP full (BL21 codon plus)를 다른 원료와 혼합하여 사용 시 기존 호흡기형인 M41의 원료보다 반응성 높아지는 것을 확인하였음.

○ IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 제작

IBV QX NP partial



IBV QX NP partial

3. Sequencing

<DNA>

```

NP Backbone      1 -----
NP 시퀀싱        1 atgagcgtataaaatttccactgactgcagcagtttgacacggatgtactcaaaaggagcgggggacccctcgtgattttctgggcagagtggtgcggtccgtgcgaaaatgctgcctccgcttctgcatgeaatcgc
NP Backbone      141 -----
NP 시퀀싱        141 tgcgaatctcagggcaaaactgcogttgcaaaactgaacatcgatcaaaacctggcactgcgcgaaatctggctccctggtatcccccactctctgctcttccaaaacggtgaagtggcgcaaccaagtggtg
NP Backbone      281 -----
NP 시퀀싱        281 cactgtctaaaggctcagttgaaagagttccctgcagctaacctggccggttctggttctggccatgacccatcatcatcattcttctggtctggctccacgggttctggtatgaaagaaaccgctgctctaaa
NP Backbone      421 -----
NP 시퀀싱        421 ttgaaagcgcagccactgagccagccagatctggatctggatcagcagcagcagccatgctgctgattcagatccatgagcttccagcttccagcagccatctgagctcagcagccatctgagctcagc
NP Backbone      561 -----
NP 시퀀싱        561 aagaagttccagctggctgtaggagctggagctgaaagagatctcgtctcctggcggcaaaagattatcaggaccagcaaaagaaaggtacggctattcaaaagcaaaaagcagatgagatggctccacgctgattctgta
NP Backbone      701 -----
NP 시퀀싱        701 agcgtaccattccacaggttctagatgagatcaagatcttggccctcgtcaaaagctaaagggaaaggttctggatgacaaagctaaagggaaaggtctaaagggaaaggtctaaagggaaaggtctaaagggaaaggt
NP Backbone      841 -----
NP 시퀀싱        841 cctagcccacatgctctccttttggaaatgagatgagggcccaagcttcaaacagatgggctcaccctagatttgaatttactactggtgctcagagatgacccggcagtttgataactatgaaagatcttgatga
NP Backbone      981 -----
NP 시퀀싱        981 gctgtctgattggttaggcacacgcccacaaagcgaagttgcaagaccacaaatcagctcaagttcaagacctgctcaaaagggaaaggttccagggccaaacacacagcggccaaagggaaaggtcgaagggaaaggt
NP Backbone      1121 -----
NP 시퀀싱       1121 aggatgctgaaatggatcaaaagctgacctcagatgagggaaagaaacatgcaagctggaattctgatgacaccccaaaatgattcaattgudtctgattcagcactctgtaaaatgaaactacgaactcctctgacaa
NP Backbone      1261 -----
NP 시퀀싱       1261 cttggggcgcactcgagccaccaccaccacactcgagatccggctgtaa
    
```

<Amino acid>

```

NP Backbone      1 -----
NP 시퀀싱        1 #adkiihltdsfvdkhadgallvdfvawecgckslaplldeadeygglltvalnkndgppatapykylrglptllifngveaackvwelakgllkefidenlagagrhshhhhhhhsslvrgagktcaakl
NP Backbone      421 -----
NP 시퀀싱        421 IerqhdagpdlgtdddkaaradlqshtrgrataaaaaarvprszegatrrrsgaedliaraakliqqdqkgttrtkkqademaahrFokrtlppgyrvdgvfprrtkqkegnfgddmneeikdgrvtaalnlt
NP Backbone      841 -----
NP 시퀀싱        841 pphbaclfgevrvpklapdglhlfefctvprddpfdnyvkiideevdvtrpkdevvprkarsarpatrnspapkgqrkckekpkkqddvdkaletdeernnaqlfddepkvinwgdaalgknel-----
NP Backbone      1261 -----
NP 시퀀싱       1261 iaalelhhhhhh
    
```

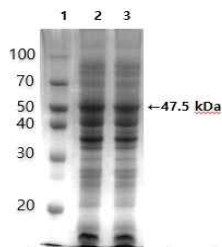
<그림 8> IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 유전자 작업

○ IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 발현 및 정제

IBV QX NP partial

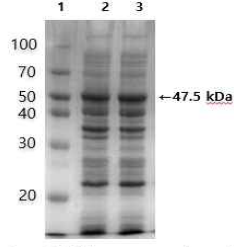
4. 발현

NP partial - **BL21DE3**



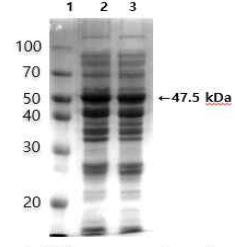
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX NP partial cell lysate total
Lane 3: IBV QX NP partial cell lysate sup.

NP partial - **BL21 codon plus**



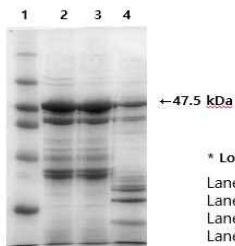
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX NP partial cell lysate total
Lane 3: IBV QX NP partial cell lysate sup.

NP partial- **AD494**



Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX NP partial cell lysate total
Lane 3: IBV QX NP partial cell lysate sup.

5. 정제



* Load to Ni-NTA (GE, Chelating 5ml)

Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: purified pET32a-NP partial - BL21DE3
Lane 3: purified pET32a-NP partial - codon plus
Lane 4: purified pET32a-NP partial - AD494

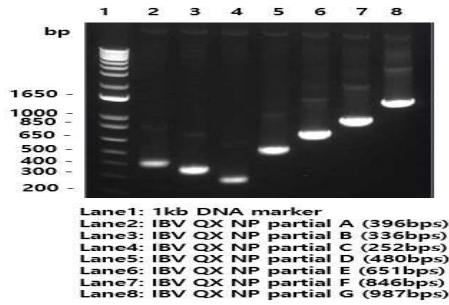
<그림 9> 신장형 IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 발현 및 정제 확인

- IBV 변이주 (QX type)의 *E.coli* expression system을 이용한 재조합단백질의 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과, NP partial 항원은 반응성이 안 좋은 것을 확인하였음 (결과 미 첨부).

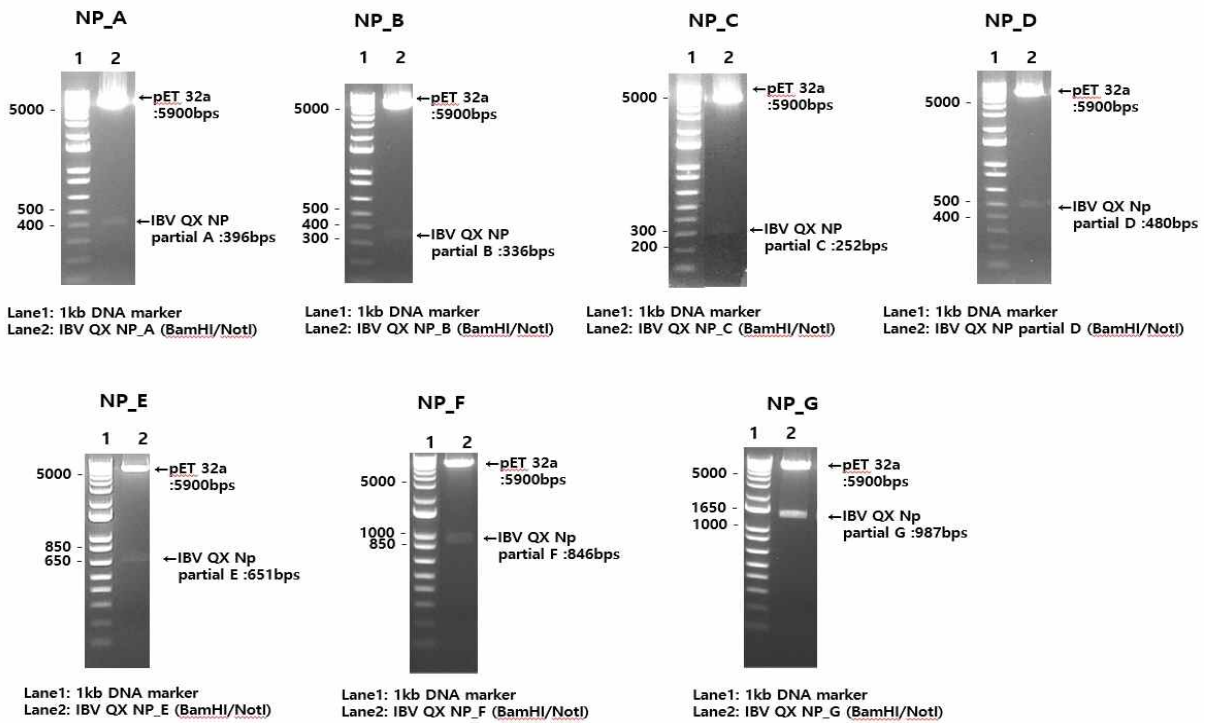
○ IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 제작 (항원성 규명)

IBV QX NP Truncation

1. PCR



2. Cloning



3. Sequencing_E

<DNA>

```
NP Backbone 1 -----
NP partial E 1 atgagcgtataaaattaccctgactgacgacagtttgacacggatgactcaaaagcgaagggcgctctccctgctgattctgggcagagtggtgctgctcgtgcaaaatgatccccccattctggaagaatcgc
NP Backbone 1 -----
NP partial E 141 tgacgaatcagggcaactgaccgttgcaaaactgaacatcgatcaaaacctggactgcgcgaatattggatccggtgatccccactctgctgcttcaaaaacggtgaagtggtgcaaccaaaagtgggtg
NP Backbone 1 -----
NP partial E 281 cactgctcaaaagtcagtgaaagagttcctcgaagcctaacctggcgggtctcgttctggccatgacaccatcatcatcattctctggtctggtgccaacgggtcttggtatgaaagaaccgctgctgctaaa
NP Backbone 1 -----
NP partial E 421 ttgcaacccagcacatggacagccagatctgggtaccgacgacgacgaagccatggctgatactggatccatggcaagcggtaaggtatctggaaagacagactccccctcgcaatcatcaaaactaggagggcc
NP Backbone 66 -----
NP partial E 561 aaaaccacctaaagtgaggctcacttggaatgcatcttggttccagctctcaaaagcgaagaaactaaatcaacctctctctgatttgaagtagtggtgctctgataatgaaactcaaaatctagccagcagcatg
NP Backbone 206 -----
NP partial E 701 gatactggagcccaagccaggtataagcaagcgaagggcgaagaaacacagctccctgactgactgctctctattatatacaggaacagcagccgctgactgaattgggggtgattctcaagatggtatagtggtg
NP Backbone 346 -----
NP partial E 841 gttgctgccaaggtgctgctgataaactcagatccaatcaggtacaagagatcctgataaagttgaccaatctccactacggtttccagatggaggaactgattgtaattccctgggattcattctctgaaatcg
NP Backbone 486 -----
NP partial E 981 tggtaggagtgagggtgactgacgctctcagcagcactcagtagagtgccgtctcagaaggttcacgtggtcgtgagagtgagctgaagaagatctgattgctcgtgcccgaagatattcaggaaccagcaaa
NP Backbone 626 -----
NP partial E 1121 ggaaggtacgctattcaaaagcaagcggccgactcagagaccaccaccaccaccactga
```

<Amino acid>

```
NP Backbone 1 -----
NP partial E 1 msdkiihltdsfdtdvldkdgallvdfwaecgpcnkriapildeiadeyggklrvaklnidqngptapykigirgipitllllkngveaatkvgalakglkefldanlagsgghhhhhhhssglvprg
NP Backbone 1 -----
NP partial E 391 sgrketaaakferqhrdspdldgtdddkaradigsaaagkvsqktdspspiklqgkpkpkvsgasnaawfqlkakklnsppmfegsgvdpnenkssqghywrqarykqkqkpkvdpawifyy
NP Backbone 286 -----
NP partial E 781 tggtpaadlnwdsqgdvivaakgadvkrsnqgtrdpdkfdqflrfdsqgpdgnfrwdfiplnrgrgrstaasaaasrvpsregsrgrgaaedliaraakiidqqrkgrtrtkq-----
NP Backbone 652 -----
NP partial E 1171 hhh*
```

3. Sequencing_F

<DNA>

```
NP Backbone 1 -----
NP partial F 1 atgagcgtataaaattaccctgactgacgacagtttgacacggatgactcaaaagcgaagggcgctctccctgctgattctgggcagagtggtgctgctcgtgcaaaatgatccccccattctggaagaatcgc
NP Backbone 1 -----
NP partial F 141 tgacgaatcagggcaactgaccgttgcaaaactgaacatcgatcaaaacctggactgcgcgaatattggatccggtgatccccactctgctgcttcaaaaacggtgaagtggtgcaaccaaaagtgggtg
NP Backbone 1 -----
NP partial F 281 cactgctcaaaagtcagtgaaagagttcctcgaagcctaacctggcgggtctcgttctggccatgacaccatcatcatcattctctggtctggtgccaacgggtcttggtatgaaagaaccgctgctgctaaa
NP Backbone 1 -----
NP partial F 421 ttgcaacccagcacatggacagccagatctgggtaccgacgacgacgaagccatggctgatactggatccatggcaagcggtaaggtatctggaaagacagactccccctcgcaatcatcaaaactaggagggcc
NP Backbone 66 -----
NP partial F 561 aaaaccacctaaagtgaggctcacttggaatgcatcttggttccagctctcaaaagcgaagaaactaaatcaacctctctctgatttgaagtagtggtgctctgataatgaaactcaaaatctagccagcagcatg
NP Backbone 206 -----
NP partial F 701 gatactggagcccaagccaggtataagcaagcgaagggcgaagaaacacagctccctgactgactgctctctattatatacaggaacagcagccgctgactgaattgggggtgattctcaagatggtatagtggtg
NP Backbone 346 -----
NP partial F 841 gttgctgccaaggtgctgctgataaactcagatccaatcaggtacaagagatcctgataaagttgaccaatctccactacggtttccagatggaggaactgattgtaattccctgggattcattctctgaaatcg
NP Backbone 486 -----
NP partial F 981 tggtaggagtgagggtgactgacgctctcagcagcactcagtagagtgccgtctcagaaggttcacgtggtcgtgagagtgagctgaagaagatctgattgctcgtgcccgaagatattcaggaaccagcaaa
NP Backbone 626 -----
NP partial F 1121 ggaaggtacgctattcaaaagcaaaagcagatgagatggtcaccgctcgtattctgtaggctaccatccaccaggtatagatagatcaagatttggcctcgtgactaaagtgaggaggaatatttggatg
NP Backbone 766 -----
NP partial F 1261 gacaagatgaatgaggaaggtattaaggtggcgtgttaagcaatgctcaaccttaccactagcccacatgctgtctt-----

```

<Amino acid>

```
NP Backbone 1 -----
NP partial F 1 msdkiihltdsfdtdvldkdgallvdfwaecgpcnkriapildeiadeyggklrvaklnidqngptapykigirgipitllllkngveaatkvgalakglkefldanlagsgghhhhhhhssglvprgsgrketaaak
NP Backbone 1 -----
NP partial F 421 ferqhrdspdldgtdddkaradigsaaagkvsqktdspspiklqgkpkpkvsgasnaawfqlkakklnsppmfegsgvdpnenkssqghywrqarykqkqkpkvdpawifyyftgtpaadlnwdsqgdviva
NP Backbone 346 -----
NP partial F 841 vaakgadvkrsnqgtrdpdkfdqflrfdsqgpdgnfrwdfiplnrgrgrstaasaaasrvpsregsrgrgaaedliaraakiidqqrkgrtrtkqkademahrfrckrtippgyrvdqvfqprtkqkegnfgd
NP Backbone 766 -----
NP partial F 1261 dkmeegikdgrvtamlntpsphaci-----

```


3. Sequencing_G

<DNA>

```

NP Backbone      1 -----
NP partial G     1 atgagcgataaaattattcacctgactgacgcagctttgacacggatgtactcaaaaggcagggggcagctcctcgtcgtatttctgggcagagtggtgcggtccgtgcaaaatgatcgccccgattctgt
NP Backbone      1 -----
NP partial G     131 atgaaatcgtgacgaatcaggggcaactgaccgttgcaaaactgascactcgtacaaaacctggcactgcccgaatattggcatccgtggtatcccactctcgtcgtgttcaaaaacggtgaagt
NP Backbone      1 -----
NP partial G     261 ggcggcaaccaaaagtggtgactcgtctataaaggtcagttgaaaggttcctcgacgctaactggccggttctggtctcggcoaatgaccatcatcatcattctctggtctggtgccacgggt
NP Backbone      1 -----
NP partial G     351 tctggtatgaaagaaaccgctgctgtaattcgaacggcagccacatggacagccagatctgggtaccgacgacgacgaagccatggctgatcggatccatggcaagcggtaaggtatctggaa
-----atggcaagcggtaaggtatctggaa
NP Backbone      26 agacagactccccctgcacaatcacaactaggaggggcaaaaccactaaagtagggtcatctggaaatgcatcttgggtccagctctcaaaaggccaagaactaaattcacctcctctatgtttga
NP partial G     521 agacagactccccctgcacaatcacaactaggaggggcaaaaccactaaagtagggtcatctggaaatgcatcttgggtccagctctcaaaaggccaagaactaaattcacctcctctatgtttga
-----
NP Backbone      156 aggtagtggtgttctcgtataatgaaaatctaaaatctagccagcagcagtgatctggagacgcaaacgggtataagcaagggcaagggcgaagaaaccagtcctcctgatcaggttctctattat
NP partial G     651 aggtagtggtgttctcgtataatgaaaatctaaaatctagccagcagcagtgatctggagacgcaaacgggtataagcaagggcaagggcgaagaaaccagtcctcctgatcaggttctctattat
-----
NP Backbone      286 acaggaacagggaccagcgtgactgaaatgggggtattctcaagatggatagtggtggttctgccaaggtgctgataaaatctagatccaatcagggtaacaagagatcctgataagttgacc
NP partial G     781 acaggaacagggaccagcgtgactgaaatgggggtattctcaagatggatagtggtggttctgccaaggtgctgataaaatctagatccaatcagggtaacaagagatcctgataagttgacc
-----
NP Backbone      416 aatttccactacggttttcagatggagacctgatgtaattccogttgggatttcaatcctctgaatcgtggtaggatggaggtcgactgcagcttcatcagcagcactctagtagagtcogctctcg
NP partial G     911 aatttccactacggttttcagatggagacctgatgtaattccogttgggatttcaatcctctgaatcgtggtaggatggaggtcgactgcagcttcatcagcagcactctagtagagtcogctctcg
-----
NP Backbone      546 agaagtttcaagtggtctgtaggagtgagctgaagaagatctgattgctcgtcggcgaagattattcaggaccagcaaggaaggtacgctattacaagcaaaagggcagatgagatggctcacogt
NP partial G     1041 agaagtttcaagtggtctgtaggagtgagctgaagaagatctgattgctcgtcggcgaagattattcaggaccagcaaggaaggtacgctattacaagcaaaagggcagatgagatggctcacogt
-----
NP Backbone      676 cgattctgtaagcgtaccattccaccaggttatagatagatcaagattttggccctgactcaaaaggttaaggggggaaattttgggtgatgacaagatgagtagggaaggtataaggatggcgtgtta
NP partial G     1171 cgattctgtaagcgtaccattccaccaggttatagatagatcaagattttggccctgactcaaaaggttaaggggggaaattttgggtgatgacaagatgagtagggaaggtataaggatggcgtgtta
-----
NP Backbone      806 cagcaatgctcaacctcaccactagcccacatgcttctcttttggagtagagtagcggcccaagcttcaaccagatgggcttcaacctagattgaaattactactgtggtgcttagagatgaccggca
NP partial G     1301 cagcaatgctcaacctcaccactagcccacatgcttctcttttggagtagagtagcggcccaagcttcaaccagatgggcttcaacctagattgaaattactactgtggtgcttagagatgaccggca
-----
NP Backbone      936 gtttgataattatgtaaaagatttgatgagtggttgatggtgtagggcaca-----
NP partial G     1431 gtttgataattatgtaaaagatttgatgagtggttgatggtgtagggcaca-----

```

<Amino acid>

```

NP Backbone      1 -----
NP partial G     1 madkiihltdsfdtdvkkadgailvdfwaewcgpckrlapildeiadeyggkltvaklnldqngpkygigirgipllllfkngveaatkvgalckglkefldanlagagaghhhhhhhsaglvrgagrmetaak
-----
NP Backbone      1 -----
NP partial G     421 ferqhndspdlgtdddkanadigsaaagkvsyktddspilklggppkpkvsgnawfwqalkaklinsppmfegagvdpnenlksaqhgvyrrqarykqkkggkpvpdawfyfytotgpaadinwdsqdgilw
-----
NP Backbone      346 vaakgadvkarsnqgtrdpdkfdqfplrfadgppdgnfrwdfiplnrgragrstaaasaaasrvpregrsgrrrsgaeedliaraakliqdgqrkytritkykademahrfrckrtlppgyrvdqvfprtkykegnfgd
NP partial G     841 vaakgadvkarsnqgtrdpdkfdqfplrfadgppdgnfrwdfiplnrgragrstaaasaaasrvpregrsgrrrsgaeedliaraakliqdgqrkytritkykademahrfrckrtlppgyrvdqvfprtkykegnfgd
-----
NP Backbone      766 dkmeegikdgrvtaminltpshacifgarvtpklpddgihlrfefvtvprddpqqfdnykicdecvdgvt-----
NP partial G     1261 dkmeegikdgrvtaminltpshacifgarvtpklpddgihlrfefvtvprddpqqfdnykicdecvdgvt-----aaalehhhhh*

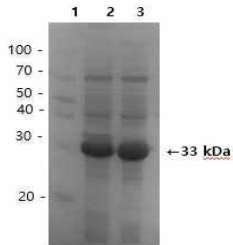
```

<그림 10> IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 유전자 작
업

○ IBV 변이주 (QX type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 발현 및 정제

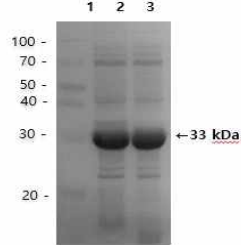
4. 발현

NP_A BL21(DE3)



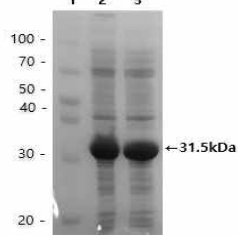
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial A cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial A cell lysate sup.

NP_A codon plus



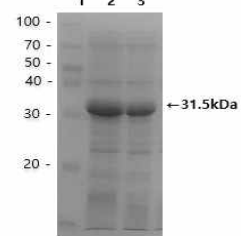
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial A cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial A cell lysate sup.

NP_B BL21(DE3)



Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial B cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial B cell lysate sup.

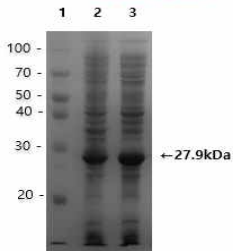
NP_B codon plus



Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial B cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial B cell lysate sup.

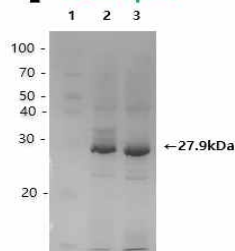
4. 발현

NP_C BL21(DE3)



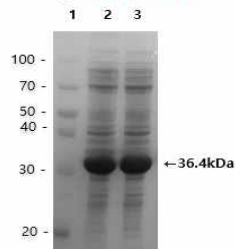
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial C cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial C cell lysate sup.

NP_C codon plus



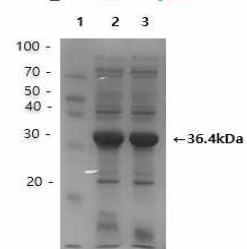
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial C cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial C cell lysate sup.

NP_D BL21(DE3)



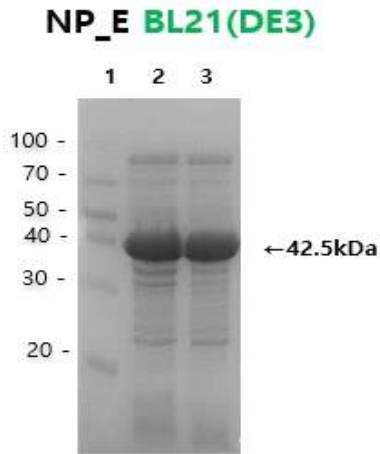
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial D cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial D cell lysate sup.

NP_D codon plus

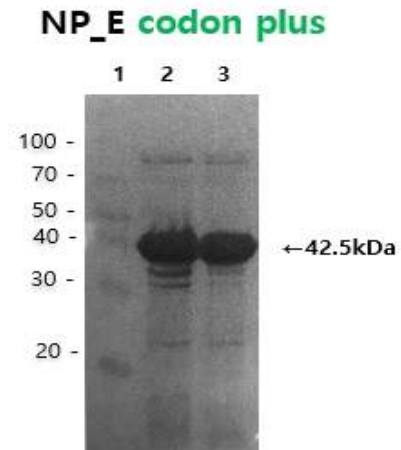


Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: IBV QX Np partial D cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial D cell lysate sup.

4. 발현

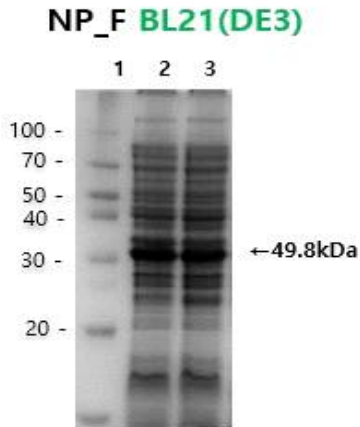


Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial E cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial E cell lysate sup.

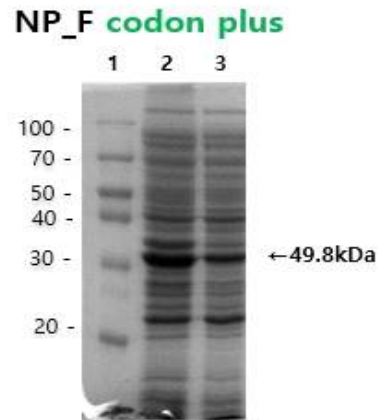


Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial E cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial E cell lysate sup.

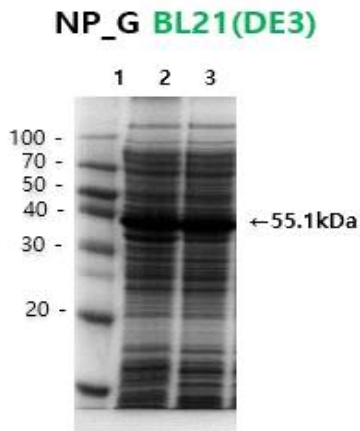
4. 발현



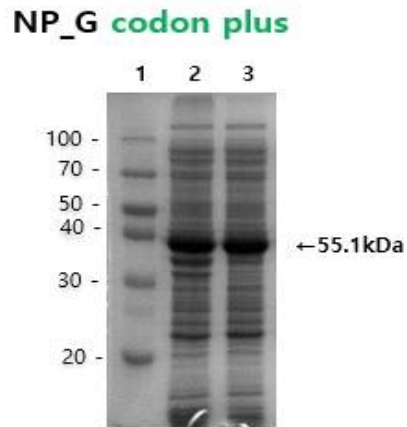
Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial F cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial F cell lysate sup.



Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial F cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial F cell lysate sup.

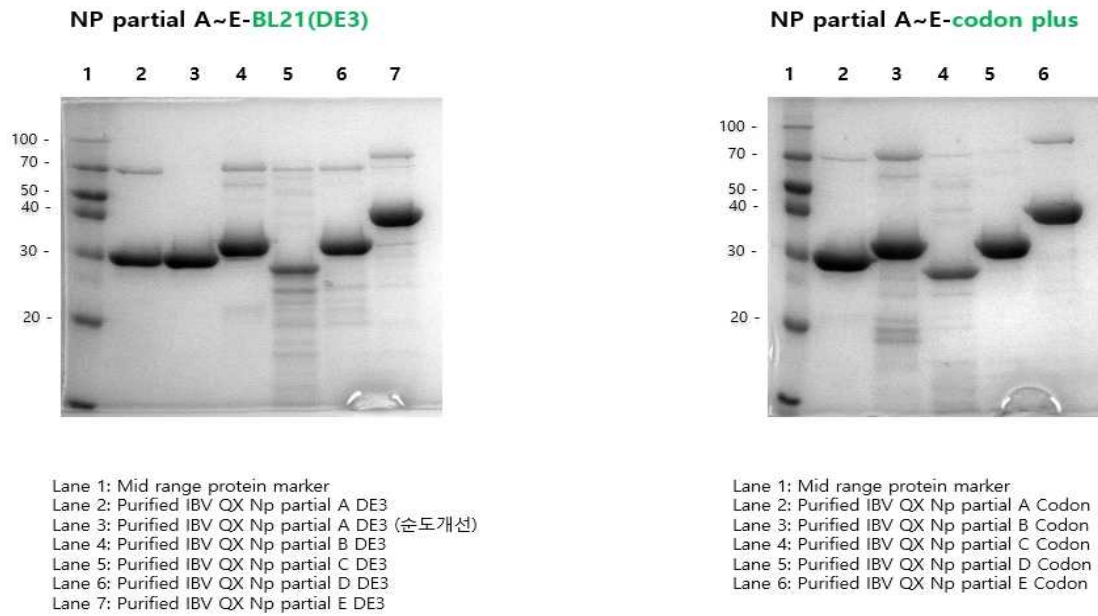


Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial G cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial G cell lysate sup.



Lane 1: Mid range protein marker
Lane 2: pET32a codon plus cell lysate total
Lane 3: IBV QX Np partial G cell lysate total
Lane 4: IBV QX Np partial G cell lysate sup.

5. 정제

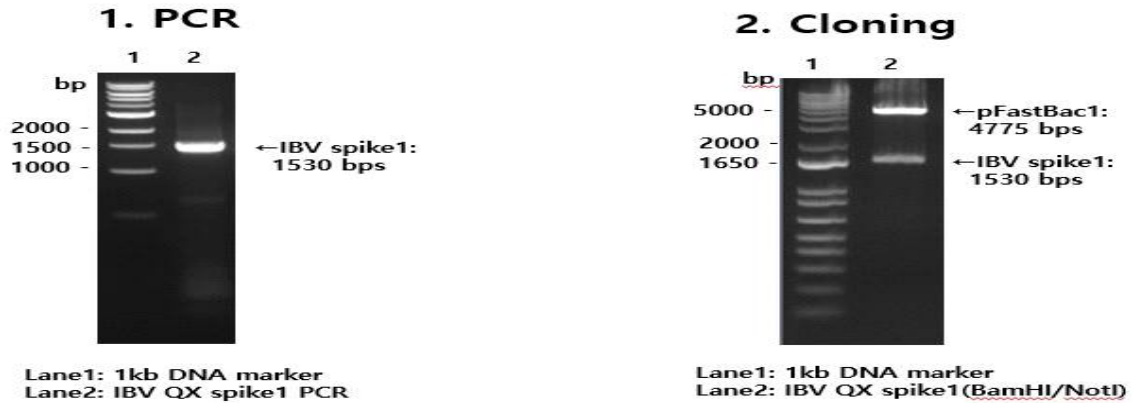


<그림 11> IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 발현 및 정제 확인

- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated F와 G의 경우, 단백질 발현까지는 확인하였으나, 투석 과정에서 엉김현상이 발생하여 항원성을 규명하기 위한 테스트는 하지 못했음

○ IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 제작

IBV QX Spike



IBV QX Spike

3. Sequencing

<DNA>

```

S1 backbone 1 ---Batgtgactactaccacaagtgctttttgagccgcaaatgggtggccactcacaaggaggtgcttctcagtagtccactccactaattatactaaatgacgggtcttgcacatgagtgcaactgttggtttatgaagatggtttataatcaaaagtg
S1 시퀀싱 1 Atgtatggtgactactaccacaagtgctttttgagccgcaaatgggtggccactcacaaggaggtgcttctcagtagtccactccactaattatactaaatgacgggtcttgcacatgagtgcaactgttggtttatgaagatggtttataatcaaaagtg
S1 backbone 158 Tggcttccatagttatgacagcacccttccaggtatgcttgaagtcacaactctctgtagtgcacactgtaactttctgaaattacagttttgtccacactgtttatagtagtgtgtgtgggtcttgcctacaacagcatgattccacgtga
S1 시퀀싱 158 Tggcttccatagttatgacagcacccttccaggtatgcttgaagtcacaactctctgtagtgcacactgtaactttctgaaattacagttttgtccacactgtttatagtagtgtgtgtgggtcttgcctacaacagcatgattccacgtga
S1 backbone 318 Tcatattggtattcttgcgaatgcaaaatggtctttctttatatacttcaacgttaggtctatcaaacctcaatttcaactcttcaatggttcaacacttccacatgcttcttatttaagtggatcttcttacttcccaaaaactactgaa
S1 시퀀싱 321 Tcatattggtattcttgcgaatgcaaaatggtctttctttatatacttcaacgttaggtctatcaaacctcaatttcaactcttcaatggttcaacacttccacatgcttcttatttaagtggatcttcttacttcccaaaaactactgaa
S1 backbone 478 Gttcactgacagcaggtgtgatattttaaagcagtggaacctgaaatatagtatatagaagaatttaaggtctctgctacttctgtaattgtcacagcacaagatgcaattttgtggacaattcccccaagggtttgcaagcttgaatatacaactg
S1 시퀀싱 481 Gttcactgacagcaggtgtgatattttaaagcagtggaacctgaaatatagtatatagaagaatttaaggtctctgctacttctgtaattgtcacagcacaagatgcaattttgtggacaattcccccaagggtttgcaagcttgaatatacaactg
S1 backbone 638 Gcaattttccagatggtcttaccctttcaataaagatcttctttaggaaaggtctcatgctatcaggaagatggttaactactactctgggttaactaaattccacttttaataatgaaagtaagcaacagcotaatgagttgggttcaatag
S1 시퀀싱 641 Gcaattttccagatggtcttaccctttcaataaagatcttctttaggaaaggtctcatgctatcaggaagatggttaactactactctgggttaactaaattccacttttaataatgaaagtaagcaacagcotaatgagttgggttcaatag
S1 backbone 788 Ttttcattctatacaaaaacacagcctcaggtggtttatatacttcaatttcaattctctgagtttctgtatagaagcaagtgtattttatgtagtggctccacacccatggttcttctttagacaacacacattatagtgcttgggtt
S1 시퀀싱 801 Ttttcattctatacaaaaacacagcctcaggtggtttatatacttcaatttcaattctctgagtttctgtatagaagcaagtgtattttatgtagtggctccacacccatggttcttctttagacaacacacattatagtgcttgggtt
S1 backbone 958 Aattctcttccagtttctcttactatggaacctcagggaggtgaaagcaatctgttttctggtgtaagcaagctgtttgtaagcactcttataaaggccaatggcgtgtaaaaggttttattcaggtgaattaaagcaattctgaaatg
S1 시퀀싱 961 Aattctcttccagtttctcttactatggaacctcagggaggtgaaagcaatctgttttctggtgtaagcaagctgtttgtaagcactcttataaaggccaatggcgtgtaaaaggttttattcaggtgaattaaagcaattctgaaatg
S1 backbone 1118 Gatttgctggtttatggtactaaagatgaggtctctgtatcacagactagaacagagccttagtattaacgcaatcacattataaataatcaacttccataaagcgtgtgctataataatagcagagatggtttttatccatgctgaa
S1 시퀀싱 1121 Gatttgctggtttatggtactaaagatgaggtctctgtatcacagactagaacagagccttagtattaacgcaatcacattataaataatcaacttccataaagcgtgtgctataataatagcagagatggtttttatccatgctgaa
S1 backbone 1278 Tgattctctgcaatttttacttatttagcagatggtggtctgacttttcaagcaagctgggtgacatagatgtttttgttcaagggcactatggttcaattatcaaaaggttaactctctggaatgcttaatacaacatttctgactctgg
S1 시퀀싱 1281 Tgattctctgcaatttttacttatttagcagatggtggtctgacttttcaagcaagctgggtgacatagatgtttttgttcaagggcactatggttcaattatcaaaaggttaactctctggaatgcttaatacaacatttctgactctgg
S1 backbone 1438 ggcaatagttgycattctactctotagaatgaaacaggtctgaaaggtggaacacagtttat -----
S1 시퀀싱 1441 ggcaatagttgycattctactctotagaatgaaacaggtctgaaaggtggaacacagtttat catctatcatcatcatca
    
```

<Amino acid>

```

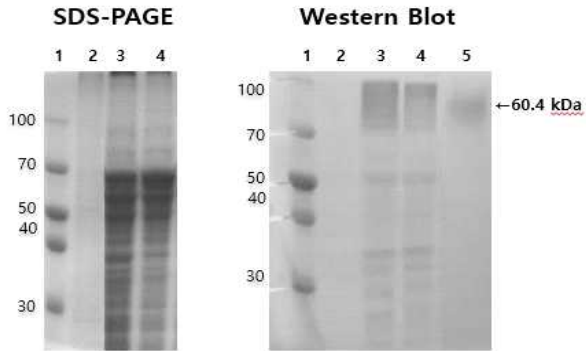
S1 backbone 1 -fyyvyyqefppngwhlqggayvrvnntnytnnagahectvgykdyvngvvasiamtapiqmwakskqfcahcnfaeitvfvthcysegagcpitgmiprdhriisaankngalfynltvsvkykpnfkqfcvsn
S1 시퀀싱 1 myyyvyyqefppngwhlqggayvrvnntnytnnagahectvgykdyvngvvasiamtapiqmwakskqfcahcnfaeitvfvthcysegagcpitgmiprdhriisaankngalfynltvsvkykpnfkqfcvsn
S1 backbone 418 nftavyingdlvrfanktktdvtcaagvvtkagppvnyisakefvlayfvngtgdvliodnspklllacqyntgnfsgdfyptnatlvrekfivryesavntlalntnftfvnaapnagvntzhllyqtcaagv
S1 시퀀싱 421 nftavyingdlvrfanktktdvtcaagvvtkagppvnyisakefvlayfvngtgdvliodnspklllacqyntgnfsgdfyptnatlvrekfivryesavntlalntnftfvnaapnagvntzhllyqtcaagv
S1 backbone 848 ynfmlrlagfvkykaadfmvgyshpccfepetinsglwfnlevaltyyplqggkqavfagkatccoyasykypmacqkvysgelamnfecgllvvytkadgarlqtrtrepvlvtqynynitlhkcvayniygrvq
S1 시퀀싱 841 ynfmlrlagfvkykaadfmvgyshpccfepetinsglwfnlevaltyyplqggkqavfagkatccoyasykypmacqkvysgelamnfecgllvvytkadgarlqtrtrepvlvtqynynitlhkcvayniygrvq
S1 backbone 1258 gfitnvtdaanfsyldggllaldtsgaldvfvvqgiyulnyykvnpcedvngqfvvsgnvlvgtltnetnseqvengfy-----
S1 시퀀싱 1261 gfitnvtdaanfsyldggllaldtsgaldvfvvqgiyulnyykvnpcedvngqfvvsgnvlvgtltnetnseqvengfyhhhhhh*
    
```

<그림 12> IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 유전자 작업

○ IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 발현 및 정제

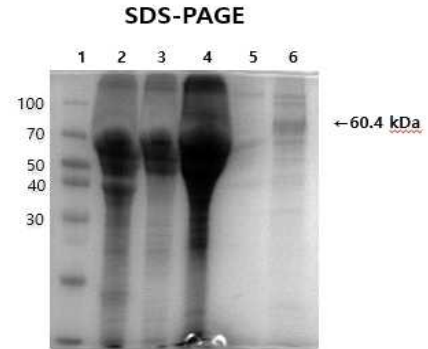
IBV QX Spike

4. 발현



Lane 1: Mid range protein marker
 Lane 2: Negative control Sf9 cell lysate total
 Lane 3: IBV QX spike1 cell lysate total
 Lane 4: IBV QX spike1 cell lysate sup.
 Lane 5: IBV QX spike1 cell lysate Media

5. 정제



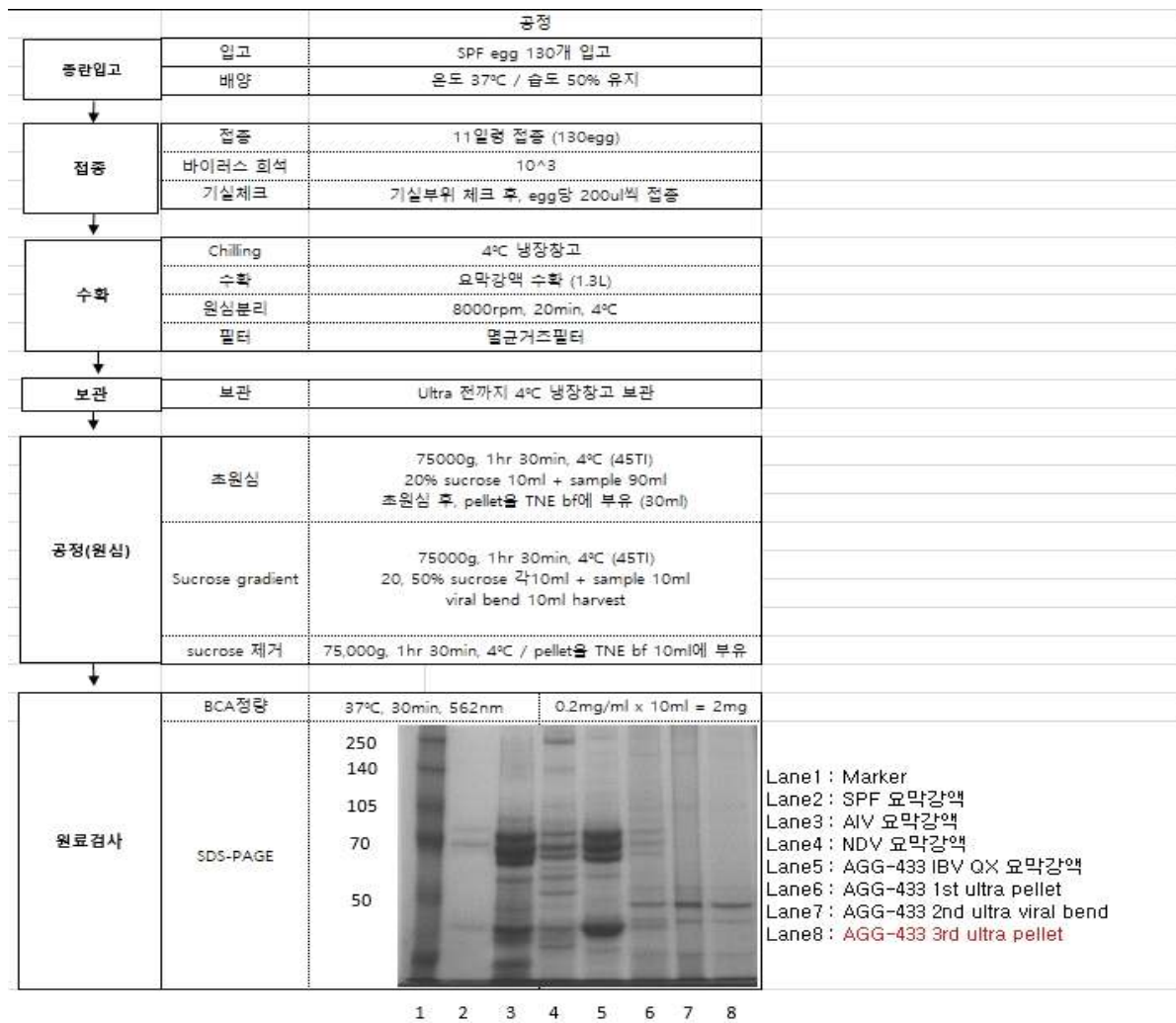
Lane 1: Mid range protein marker
 Lane 2: pFastBac1 IBV QX spike1 Media
 Lane 3: Ammonium sulfate precipitation sample
 Lane 4: Ni-NTA Flow through
 Lane 5: Ni-NTA washing
 Lane 6: Ni-NTA Elution

<그림 13> IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 발현 및 정제 확인

- IBV 변이주 (QX type)의 baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질의 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과, S1 항원은 반응성이 안 좋은 것을 확인하였음 (결과 미 첨부).

○ IBV 변이주 (QX-type) 불활화 항원 제작 (농축 및 정제)

- 진단 ELISA kit의 항원으로 평가 및 항체 제작을 위한 면역원으로 사용하기 위하여 불활화 virus 농축/정제 시스템을 이용하여 항원을 제작하였음
- 불활화 virus 농축/정제 시스템은 참고논문 (Kong *et al*, Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles, Proteome Science, 2010)에 따라 준비하였으며, 정제 순도는 다른 바이러스들과 비교하면서 SDS-PAGE 상에서 확인하였음



<그림 14> IBV 변이주 (QX-type) 불활화 항원 정제 과정 및 정제 확인

(나) IBV 변이주 (QX-type) 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 제작 (항체)

- IBV 변이주 (QX-type) 혈청형에 대한 진단 ELISA kit를 개발하기 위하여 IBV 변이주 (QX-type)의 항원성 및 중화 epitope 분석하여 *E.coli* 및 baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 제작 또는 불활화항원 농축/정제 시스템을 이용한 항원을 개발 및 제작하여 진단 ELISA kit의 항원으로 평가한 뒤 항체 제작을 위한 면역원으로 사용하였음

(나-1) IBV 변이주 (QX-type) 특이 단클론항체 및 다클론항체 제작

○ IBV 변이주 (QX-type) 불활화항원을 이용한 다클론항체 제작

- 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)를 면역원으로 Rabbit에 4차 면역 완료
- 4차 면역 후 혈청 내 존재하는 antibody titration 실시
[농축된 IBV 변이주 (QX-type)를 1ug/ml의 농도로 96well plate에 coating하여 혈청 내 항체 확인]
- Antibody titration 실시 후, 전채혈 후 정제하여 테스트

○ IBV 변이주 (QX-type) 재조합단백질을 이용한 단클론항체 제작

- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full [pET32a-NP full (BL21 codon plus)]을 면역원으로 Balb/c mouse에 4차 면역 후 혈청 내 존재하는 antibody titration 실시
[IBV 변이주 (QX-type) IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full과 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)를 1ug/ml의 농도로 96well plate에 coating하여 혈청 내 항체 확인]

<표 1> IBV 변이주 (QX-type) 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 단클론항체 면역검사 결과

Coating Antigen	IBV 변이주 (QX-type) <i>E.coli</i> 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)
Serum dilution rate	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀
1:100	1.83	0.62
1:200	1.74	0.69
1:400	1.40	0.62
1:800	1.27	0.46
1:1600	1.14	0.43
1:3200	0.93	0.42
1:6400	0.59	0.28
1:12800	0.15	0.26

- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full로 면역화된 Balb/c mouse로부터 비장(spleen)을 적출하여 myeloma cell (SP2/0-AG14) 과 fusion 하였으며, HAT selection 후 cloning 실시

- Cloning 후 단클론항체 스크린 시, IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full과 호흡기형 (M41) IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 및 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)와 농축 정제된 호흡기형 (M41) IBV를 coating 항원으로 이용한 ELISA 방법으로 IBV 변이주 (QX-type) 특이적인 단클론항체를 선발하였음
: 결과 총 2종의 IBV 변이주 (QX-type) 특이적인 단클론항체를 확보하였음.

<표 2> IBV 변이주 (QX-type) 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 단클론항체 screening
검사 결과

Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) <i>E.coli</i> 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 호흡기형 (M41) IBV	호흡기형 (M41) IBV <i>E.coli</i> 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
mAb clone	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀
7B63	0.65	0.50	0.17	0.07
11E86	0.79	0.80	0.18	0.06

- 선발된 2종의 단클론항체의 Isotype를 확인하기 위하여 Isotyping kit (Zymed, USA)를 사용하여 항체의 특성을 분석
- 선발된 2종의 단클론항체의 세포배양액을 생산하여 테스트에 이용함

○ IBV 변이주 (QX-type) 불활화항원을 이용한 단클론항체 제작

- 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)을 면역원으로 Balb/c mouse에 4차 면역 후 혈청 내 존재하는 antibody titration 실시
(농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)과 농축 정제된 호흡기형 IBV를 1ug/ml의 농도로 96well plate에 coating하여 혈청 내 항체 확인)
- 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)로 면역화된 Balb/c mouse로부터 비장(spleen)을 적출하여 myeloma cell (SP2/0-AG14) 과 fusion 하였으며, HAT selection 후 cloning 실시
- Cloning 후 단클론항체 스크린 시, 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)와 농축 정제된 호흡기형(M41) IBV를 coating 항원으로 이용한 ELISA 방법으로 IBV 변이주 (QX-type) 특이적인 단클론항체를 선발하였음
: 결과 총 23종의 IBV 변이주 (QX-type) 특이적인 단클론항체를 확보하였음.
- 선발된 23종의 단클론항체의 Isotype를 확인하기 위하여 Isotyping kit (Zymed, USA)를 사용하여 항체의 특성을 분석

〈표 3〉 IBV 변이주 (QX-type) 불활화항원 단클론항체 screening 및 isotyping 검사결과

Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	농축 정제된 호흡기형 (M41) IBV	Isotype
mAb clone	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀	
1C59	0.70	0.08	IgG2a,IgM
7B95	0.67	0.18	IgG2a
7B9	0.62	0.10	IgG2a
7D50	0.64	0.11	IgG2a,G3
7D76	0.76	0.06	IgG2a
3E63	0.82	0.05	IgG2a,G3
3E70	0.84	0.09	IgG2a,G3
5E49	1.01	0.20	IgG2a,G3
3D64	0.96	0.10	IgM,G3
3H83	0.80	0.06	IgG2a
7B17	0.50	0.06	IgG2a
7B25	0.54	0.05	IgG2a
10H32	1.69	0.07	IgG1
10H46	1.63	0.06	IgG1
9F15	1.07	0.06	IgG1
12F71	0.59	0.06	IgG1,G3
6G61	0.49	0.08	IgG2a
6G64	0.52	0.06	IgG2a
2G69	0.91	0.05	IgM,G3
2B48	0.54	0.06	IgG2b
2B50	0.77	0.09	IgG2b
11F11	0.70	0.05	IgG2a
11F86	0.69	0.05	IgG2a

- 선발된 23종의 단클론항체의 마우스 복수를 생산하여 column을 이용하여 정제하여 테스트에 이용함

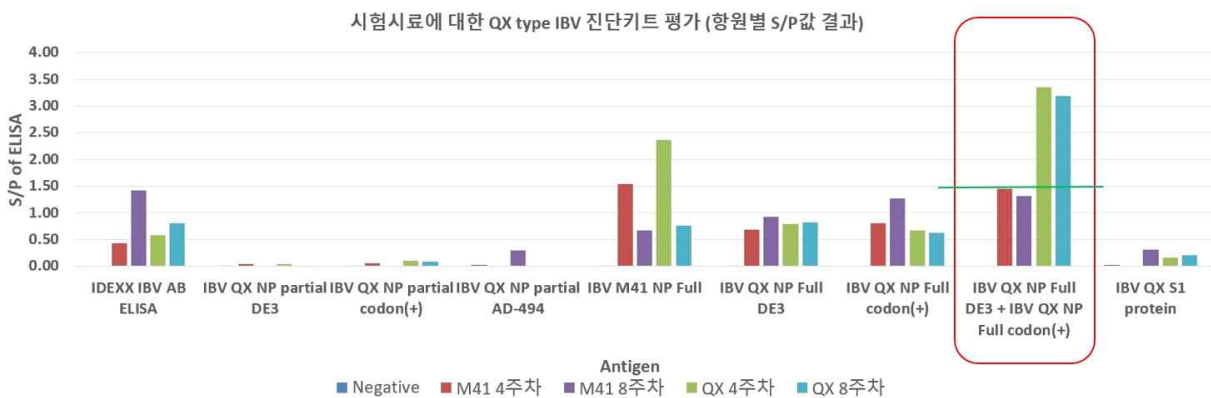
(다) 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 개발

○ IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가

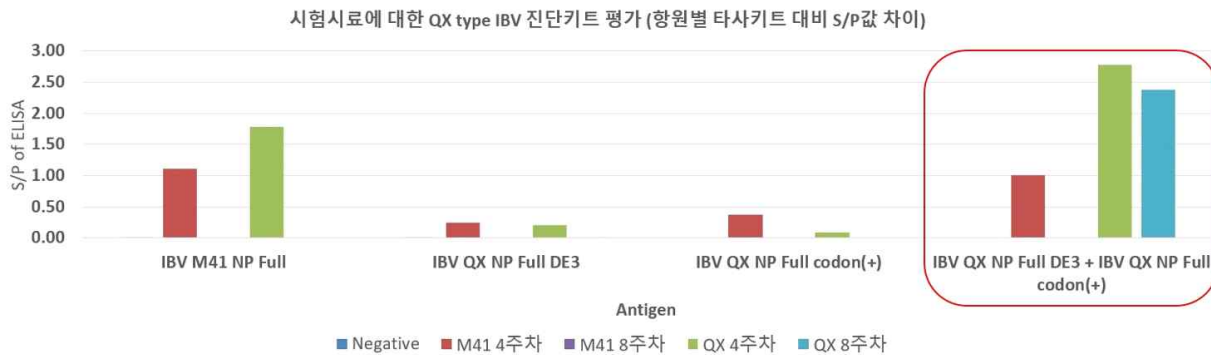
- IBV 변이주 (QX-type) 혈청형에 대한 진단 ELISA kit의 유효성을 평가하기 위해서 변이주 (QX-type) 접종 실험 시료 및 야외 시료를 대상으로 기존 ELISA kit와의 항체 검출능 비교 시험을 실시하였음

① IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) 항원 반응성 평가 (시험시료)

- SPF 닭에 QX virus, M41 virus를 각각 그룹당 6~7마리씩 접종한 뒤 접종 4주차에 다시 똑같은 방식으로 2차 접종하여 1차 접종전, 1차 접종 후 4주, 1차 접종 후 8주차에 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식으로 설정하였으며, Anti-chicken IgG HRP conjugate와 TMB Substrate를 이용하여 검체 희석 1/500으로 하여 상온에서 30분씩 각각 반응시키고 TMB Substrate 반응시간은 상온 15분 후 반응 정지시키는 방법으로 실시하였음. 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으며 시험결과 데이터는 각 그룹의 ELISA 평균 S/P값 (Sample OD값/Positive control OD값)으로 표현하였음



<그림 15> 시험시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 재조합항원 반응성 평가



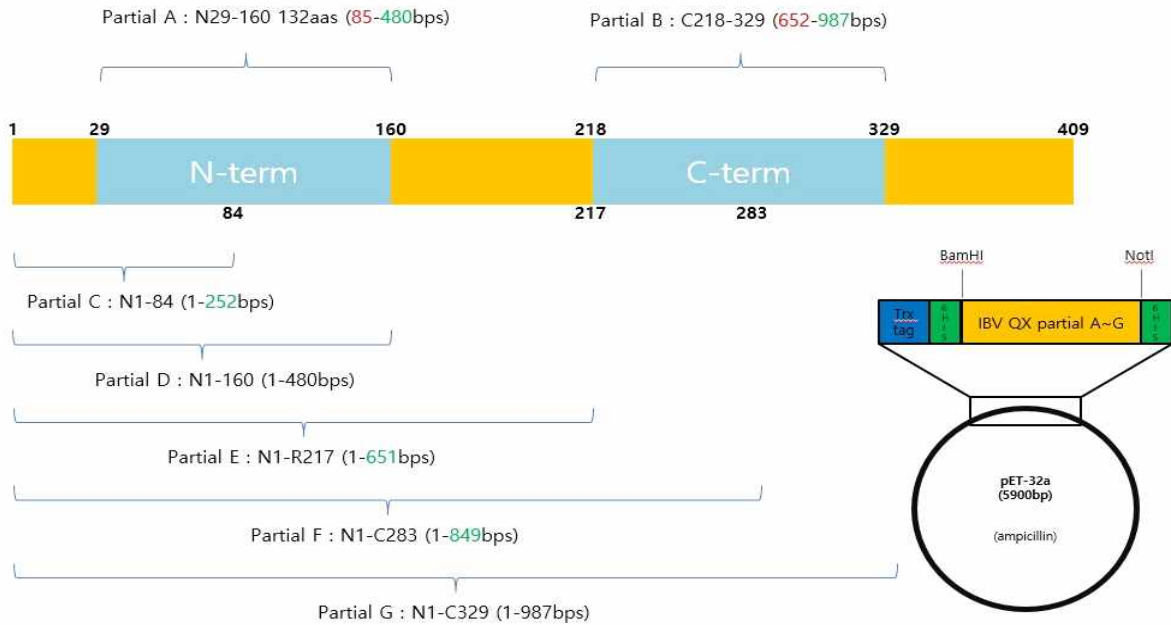
<그림 16> 시험시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 재조합항원 반응성 평가 (타사키트 대비)

- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) partial 항원과 IBV 변이주 (QX-type) baculovirus 재조합단백질 (Spike 1) 항원의 경우, 타사 키트 (IDEXX사) 제품 대비 QX virus 접종 혈청 (4주차, 8주차), M41 virus 접종혈청 (4주차, 8주차)에 대한 반응성이 저조함을 나타내었으며 (결과 미 첨부), 호흡기형 (M41) IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 항원과 IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full의 경우, 타사 키트 (IDEXX사) 제품 대비 QX virus 접종 혈청 (4주차, 8주차), M41 virus 접종혈청 (4주차, 8주차)에 대한 반응성이 비슷하거나 특정 혈청 그룹에서만 반응성이 높았음
- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full [pET32a-NP full (BL21 codon plus) & pET32a-NP full (BL21 DE3)] 항원을 혼합하여 사용한 경우, , QX virus 접종 혈청 (4주차, 8주차)에서는 타사 대비 2.0 이상의 S/P값 차이를 보이는 월등한 반응성을 나타내었으며, M41 virus 접종혈청 (4주차, 8주차)에서도 비슷하거나 약간 높은 반응성을 나타내었음
- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full [pET32a-NP full (BL21 codon plus) & pET32a-NP full (BL21 DE3)] 항원을 혼합하여 사용한 경우와 *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated D, E 항원의 경우, QX virus 접종 혈청 (4주차, 8주차)과 M41 virus 접종혈청 (4주차, 8주차) 사이에 반응성 차이가 1.5 S/P값을 기준으로 나눌 수 있는 결과로써 현존하는 진단키트에 비해 IBV 변이주 (QX-type)를 보다 잘 진단할 수 있는 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

② IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated를 이용한 항원성 및 epitope 분석

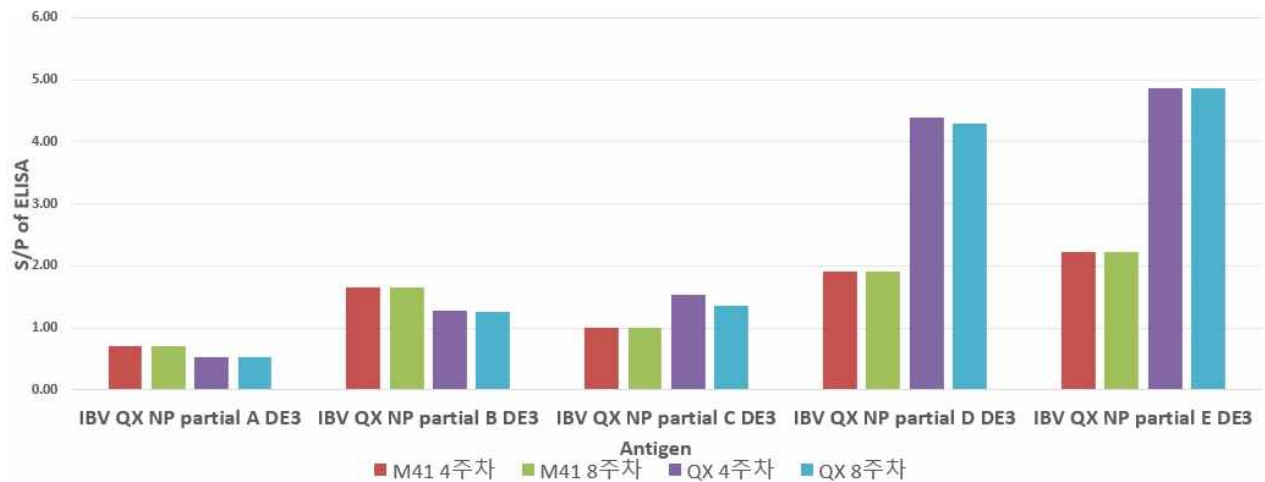
- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full [pET32a-NP full (BL21 codon plus) & pET32a-NP full (BL21 DE3)] 항원을 혼합하여 사용할 경우, IBV 변이주 (QX-type)를 잘 표현하는 데 있어 중요한 epitope 부위가 어디인지를 분석하기 IBV Nucleocapsid 단백질 전체 부위 중 N-term를 중심으로 앞 부분부터 truncation 하여 시험시료와의 반응성을 ELISA로 분석하였음

IBV NP partial Cloning design (E.coli)



<그림 17> IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated 모식도

- 시험 시료는 SPF 닭에 QX virus를 6마리씩 접종한 뒤 접종 4주차에 다시 똑같은 방식으로 2차 접종하여 1차 접종전, 1차 접종 후 4주, 1차 접종 후 8주차에 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식으로 설정하였으며, Anti-chicken IgG HRP conjugate와 TMB Substrate를 이용하여 검체 희석 1/500으로 하여 상온에서 30분씩 각각 반응시키고 TMB Substrate 반응시간은 상온 15분 후 반응 정지시키는 방법으로 실시하였음. 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으며 시험결과 데이터는 각 그룹의 ELISA 평균 S/P 값 (Sample OD 값/Positive control OD 값)으로 표현하였음



<그림 18> IBV 변이주 (QX-type) 재조합항원을 이용한 epitope 분석 반응성 평가

- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated를 이용하여 분석한 결과, 호흡기형 (M41) 항체보다 변이주 (QX-type)의 항체와 반응성이 높은 부분은 partial C, D, E 부분임을 알 수 있었으며, 이러한 사실들을 토대로 유추해볼 때 IBV 변이주 (QX-type)에 대해 특이적인 반응을 보이는 epitope 부분의 아미노산 서열 위치는 1~29, 84~217 부분에 위치하는 것으로 보임
- 상기 결과들을 토대로 특허출원이 된 상태임 [출원연도[2018년 12월], 특허명(전염성 기관지염 바이러스 재조합 뉴클레오캡시드 및 이의 용도), 출원인(메디안디노스틱, 카브), 출원번호(10-2018-0161262)]

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2018.12.13
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2018-0161262 (접수번호 1-1-2018-1254657-69)
 출원인명칭 주식회사 메디안디노스틱(1-1999-053377-2) 외 1명
 대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1)
 발명자성명 김미현 이현정 이은선 서승관 장상호 정광면 송창선
 발명의명칭 전염성 기관지염 바이러스 재조합 뉴클레오캡시드 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통행된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

<그림 19> 전염성 기관지염 바이러스 재조합 뉴클레오캡시드 및 이의 용도에 대한 특허출원증

- ③ IBV 변이주 (QX-type) 특이 단클론항체 반응성 평가
- ㉔ IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 면역원에 의해 생성된 특이 단클론항체 반응성 평가

- 선발된 2종의 단클론항체 7B63과 11E86의 세포상층액와 Anti-mouse IgG HRP conjugate를 이용하여 평가하였음
- IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated을 이용하여 선발된 2종의 단클론항체 7B63과 11E86와의 indirect ELISA 반응성 테스트 결과, 2개의 항체 모두 Partial E 부분에 반응하는 것으로 나타남

<표 4> IBV 변이주 (QX-type) 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 단클론항체의 truncated E 항원과의 반응성 검사결과

Coating Antigen mAb clone	pET32a QX NP partial E codon+
7B63	O.D ₄₅₀ 2.121
11E86	2.028

- 선발된 2종의 단클론항체 7B63과 11E86은 IBV 호흡기형 (M41)과 IBV 변이주 (QX-type) 양성검체 및 IBV 음성검체를 이용하여 신장형 IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full과 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type) 항원을 대상으로 blocking ELISA를 실시한 결과, 2개의 단클론항체 모두 blocking능이 없는 것으로 확인되어 blocking ELISA의 원료로 사용하지 못함

<표 5> IBV 변이주 (QX-type) 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 단클론항체의 blocking ELISA 반응성 검사결과

mAb clone	7B63		11E86	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) <i>E.coli</i> 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) <i>E.coli</i> 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	0.959	1.056	1.751	1.231
Negative serum 2	1.138	1.229	1.730	1.165
Anti-IBV(M41) serum 1	0.993	0.891	1.749	0.906
Anti-IBV(M41) serum 2	0.919	0.815	1.768	0.802
Anti-IBV(QX) serum 1	1.116	0.734	1.633	0.743
Anti-IBV(QX) serum 2	0.925	0.744	1.738	0.751

④ IBV 변이주 (QX-type) 불활화항원 면역원에 의해 생성된 특이 단클론항체 반응성 평가

- 선발된 23종의 단클론항체들은 HRP conjugation 키트를 이용하여 HRP conjugated mAb로 평가하였음
- 선발된 23종의 단클론항체들은 IBV 호흡기형 (M41)과 IBV 변이주 (QX-type) 양성검체 및 IBV 음성검체를 이용하여 신장형 IBV *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full과 농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type) 항원을 대상으로 blocking ELISA를 실시한 결과, 23종 중 21개의 단클론항체 모두 blocking능이 약하거나 없는 것으로 확인되어 blocking ELISA의 원료로 사용하지 못함
- 선발된 23종 중 2종의 단클론항체들 (11F11, 11F86)은 IBV 호흡기형 (M41)과 IBV 변이주 (QX-type) 양성검체 및 IBV 음성검체를 이용하여 IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) full 항원을 대상으로 blocking ELISA를 실시한 결과, 2개의 단클론항체 모두 blocking능이 어느정도 있는 것으로 확인되었으며, 추후 추가적인 연구를 통해 IBV 변이주 (QX-type) 특이적인 blocking ELISA로 사용할 수 있을지를 좀 더 평가해볼 수 있음
- 2종의 단클론항체들 (11F11, 11F86)은 IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated를 이용하여 분석한 결과, 반응성이 있는 부분은 partial B 부분임을 알 수 있었으며, 이러한 사실들을 토대로 유추해볼 때 IBV 변이주 (QX-type)에 대해 특이적인 반응을 보이는 또 다른 epitope 부분의 아미노산 서열 위치는 218~329 부분에 위치하는 것으로 보임
- 2종의 단클론항체들 (11F11, 11F86)은 상기 결과들을 토대로 특허출원이 된 상태임 [출원연도[2020년 1월], 특허명(전염성 기관지염 바이러스의 뉴클레오단백질에 대한 항체 탐지용 단클론항체 및 이의 용도), 출원인(메디안디노스틱), 출원번호(10-2020-0010654)]

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2020.01.29
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2020-0010654 (접수번호 1-1-2020-0096547-18)
출원인명칭 주식회사 메디안디노스틱(1-1999-053377-2)
대리인성명 윤대웅(9-2012-000100-1)
발명자성명 민다애 박성진 김미현 최정민 이진아 이은선 박경민 장상호 정광면
발명의명칭 전염성 기관지염 바이러스의 뉴클레오단백질에 대한 항체 탐지용 단클론 항체 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) - 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB 39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 중업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<그림 20> 전염성 기관지염 바이러스의 뉴클레오단백질에 대한 항체 탐지용 단클론항체 및 이의 용도에 대한 특허출원증

〈표 6〉 IBV 변이주 (QX-type) 불활화항원 단클론항체 screening 검사 결과

mAb clone	1C59		7B95	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.567	0.387	1.560	0.555
Negative serum 2	1.597	0.473	1.579	0.423
Anti-IBV(M41) serum 1	1.338	0.138	1.086	0.438
Anti-IBV(M41) serum 2	1.461	0.152	0.106	0.473
Anti-IBV(QX) serum 1	0.840	0.195	0.994	0.317
Anti-IBV(QX) serum 2	0.862	0.263	0.982	0.308
mAb clone	7B9		7D50	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.566	0.527	1.510	0.890
Negative serum 2	1.591	0.577	1.527	1.048
Anti-IBV(M41) serum 1	1.138	0.319	2.137	1.060
Anti-IBV(M41) serum 2	1.534	0.367	1.137	1.015
Anti-IBV(QX) serum 1	0.925	0.404	0.940	1.046
Anti-IBV(QX) serum 2	0.881	0.529	0.956	1.035
mAb clone	7D76		3E63	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.702	1.037	1.508	0.462
Negative serum 2	1.863	1.030	2.141	0.592
Anti-IBV(M41) serum	0.937	0.734	1.427	0.312

1				
Anti-IBV(M41) serum	2.137	0.746	1.575	0.484
2				
Anti-IBV(QX) serum 1	1.140	0.740	2.418	0.334
Anti-IBV(QX) serum 2	1.056	0.733	2.072	0.533
mAb clone	3E70		5E49	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.655	1.300	1.562	0.530
Negative serum 2	1.566	1.064	1.542	0.520
Anti-IBV(M41) serum 1	0.889	1.039	1.076	0.354
Anti-IBV(M41) serum 2	0.777	1.268	1.079	0.321
Anti-IBV(QX) serum 1	0.784	1.109	1.138	0.229
Anti-IBV(QX) serum 2	1.216	1.282	1.099	0.397
mAb clone	3D64		3H83	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.861	0.249	1.805	1.222
Negative serum 2	1.761	0.334	1.708	1.177
Anti-IBV(M41) serum 1	1.068	0.170	1.263	1.395
Anti-IBV(M41) serum 2	1.073	0.171	1.657	1.366
Anti-IBV(QX) serum 1	1.076	0.285	1.235	1.047
Anti-IBV(QX) serum 2	1.210	0.257	1.197	1.078
mAb clone	7B17		7B25	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full

Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.541	1.743	1.568	0.575
Negative serum 2	1.842	1.756	1.640	0.527
Anti-IBV(M41) serum 1	1.078	1.805	1.353	0.412
Anti-IBV(M41) serum 2	1.145	1.628	1.116	0.402
Anti-IBV(QX) serum 1	1.068	1.673	0.919	0.600
Anti-IBV(QX) serum 2	1.079	1.860	0.959	0.647
mAb clone	10H32		10H46	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.572	0.264	1.876	0.488
Negative serum 2	1.546	0.266	1.677	0.448
Anti-IBV(M41) serum 1	1.115	0.248	1.115	0.315
Anti-IBV(M41) serum 2	1.185	0.391	2.185	0.367
Anti-IBV(QX) serum 1	1.087	0.217	1.087	0.397
Anti-IBV(QX) serum 2	1.085	0.249	1.085	0.375
mAb clone	9F15		12F71	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	2.147	0.315	1.658	0.421
Negative serum 2	2.107	0.400	1.595	0.464
Anti-IBV(M41) serum 1	1.384	0.192	0.901	0.245
Anti-IBV(M41) serum 2	2.804	0.177	0.844	0.242
Anti-IBV(QX) serum 1	1.245	0.169	0.923	0.261
Anti-IBV(QX) serum 2	1.234	0.212	0.989	0.369
mAb clone	6G61		6G64	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli

	변이주 (QX-type)	재조합단백질 (Nucleocapsid) full		재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.500	0.522	1.832	0.695
Negative serum 2	1.867	0.594	1.835	0.644
Anti-IBV(M41) serum 1	1.094	0.532	1.104	0.313
Anti-IBV(M41) serum 2	1.131	0.506	1.132	0.354
Anti-IBV(QX) serum 1	1.696	0.660	1.215	0.576
Anti-IBV(QX) serum 2	1.477	0.619	1.064	0.794
mAb clone	2G69		2B48	
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full
Sample	O.D450	O.D450	O.D450	O.D450
Negative serum 1	1.541	0.594	1.568	0.503
Negative serum 2	1.842	0.555	1.640	0.582
Anti-IBV(M41) serum 1	1.380	0.539	1.146	0.508
Anti-IBV(M41) serum 2	1.413	0.509	1.151	0.502
Anti-IBV(QX) serum 1	0.999	0.569	1.070	0.568
Anti-IBV(QX) serum 2	0.958	0.586	1.047	0.520
mAb clone	2B50			
Coating Antigen	농축 정제된 IBV 변이주 (QX-type)	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full		
Sample	O.D450	O.D450		
Negative serum 1	1.572	0.805		
Negative serum 2	1.546	0.911		
Anti-IBV(M41) serum 1	1.469	0.599		
Anti-IBV(M41) serum 2	1.549	0.572		
Anti-IBV(QX) serum 1	1.179	0.654		
Anti-IBV(QX) serum 2	1.096	0.647		
mAb clone	11F11	11F86		

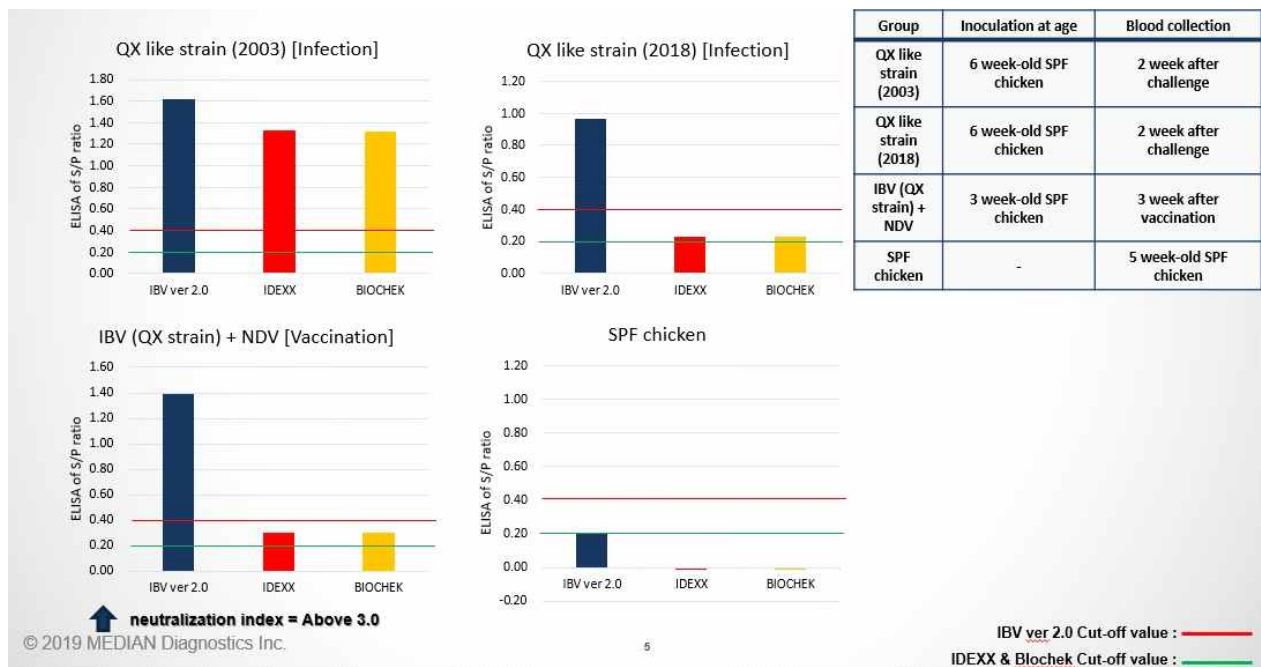
Coating Antigen	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백 질 (Nucleocap sid) full	IBV 변이주 (QX-type) E.coli 재조합단백질 (Nucleocapsid) full		
Sample	O.D450	O.D450		
Negative serum 1	3.081	2.945		
Negative serum 2	2.981	3.066		
Anti-IBV(M41) serum 1	2.131	2.022		
Anti-IBV(M41) serum 2	2.472	2.353		
Anti-IBV(QX) serum 1	0.807	0.640		
Anti-IBV(QX) serum 2	0.992	1.911		

○ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 유효성 평가

- 현존하는 진단키트에 비해 IBV 변이주 (QX-type)를 보다 잘 진단할 수 있는 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보인 IBV 변이주 (QX-type) *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) 중 *E.coli* 재조합단백질 (Nucleocapsid) truncated E 항원이 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트로써 가능성이 제일 높아보여 최종 평가에 사용하였음

① 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (시험시료 1)

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트의 유효성을 확인하기 위해 SPF 닭에 QX like strain virus (2003), QX like strain virus (2018), IBV+NDV 혼합 백신 (IBV QX strain)를 각각 그룹당 10 마리씩 접종한 뒤 접종 후 2~3주차에 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식이며 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으며 시험결과 데이터는 평균값으로 표현하였음



<그림 21> 시험시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가 1

- IBV 변이주 (QX-type) 감염시료, IBV 변이주 (QX-type) 포함 혼합백신시료에 대해 현존하는 진단키트(IDEXX사, Biocheck사)들과 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트의 반응성을 평가한 결과, 모든 시료들에서 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트의 결과값이 보다 반응성이 좋은 것으로 확인되어 IBV 변이주 (QX-type)에 대한 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

② 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (시험시료 2)

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트의 유효성을 확인하기 위해 SPF 닭에 QX like strain virus (2003), 호흡기형 virus (M41 strain) 각각 그룹당 5마리씩 접종한 뒤 접종 후 4, 8주차에 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식이며 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으며 시험결과 데이터는 평균값으로 표현하였음

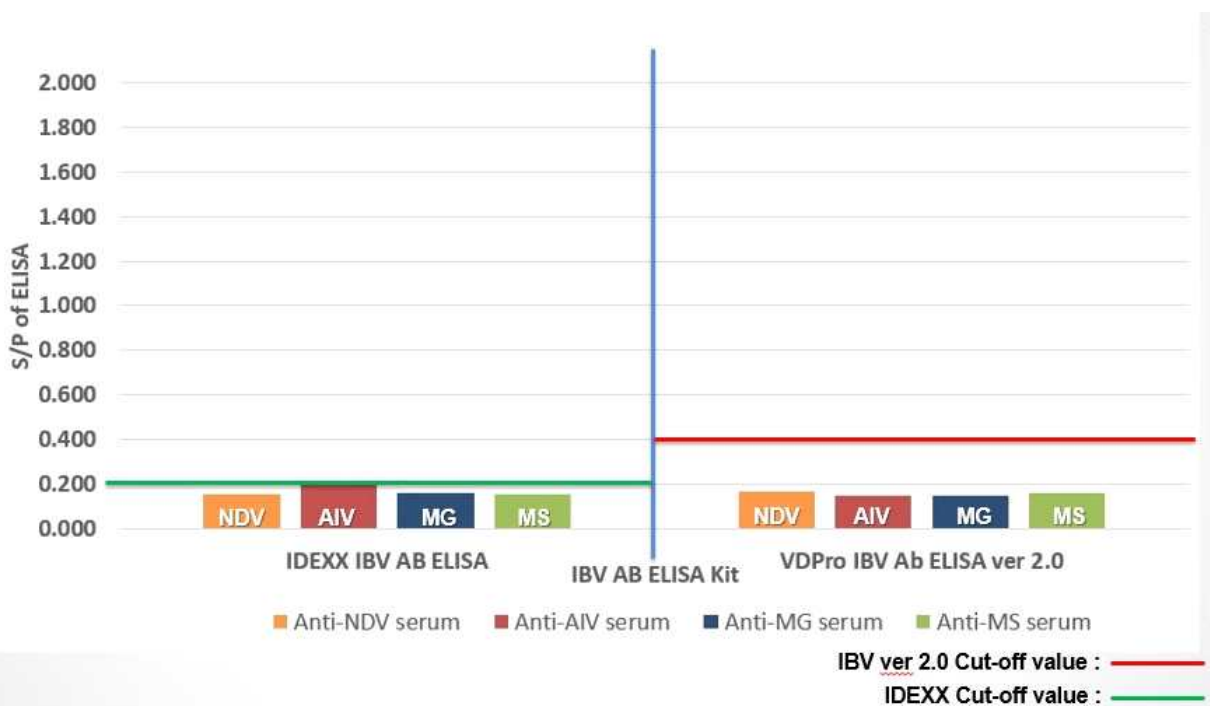


<그림 22> 시험시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가 2

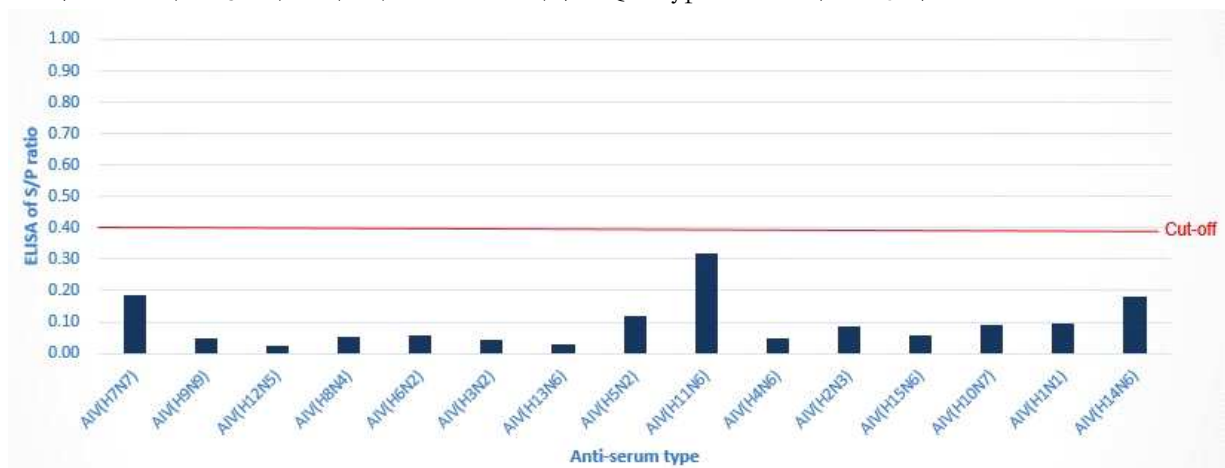
- IBV 변이주 시료 (QX-type) 와 호흡기형 시료 (M41)에 대해 현존하는 진단키트(IDEXX사,)와 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트의 반응성을 평가한 결과, 현존하는 진단키트는 IBV 변이주와 호흡기형 시료의 반응성 차이가 미미한 반면, IBV 변이주 (QX-type) 진단키트의 반응성 결과값은 IBV 변이주와 호흡기형 시료의 차이가 어느정도 있는 것으로 확인되어 IBV 변이주 (QX-type)에 대한 반응성이 좋은 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

③ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (타 질병시료)

- QX type IBV 진단 키트의 특이도를 확인하기 위해 외국에서 구입한 항혈청 시료인 AIV 항혈청 (Charles river사, APHA사), NDV 항혈청 (Charles river사), MG 항혈청 (Charles river사), MS 항혈청 (Charles river사)를 구입하여 시험 시료로 사용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식으로 설정하였으며, Anti-chicken IgG HRP conjugate와 TMB Substrate를 이용하여 검체 희석 1/500으로 하여 상온에서 30분씩 각각 반응시키고 TMB Substrate 반응시간은 상온 15분 후 반응 정지시키는 방법으로 실시하였음. 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으며 시험결과 데이터는 ELISA OD값과 S/P값으로 표현하였음



<그림 23> 타질병 시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가 1



<그림 24> 타질병 시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가 2

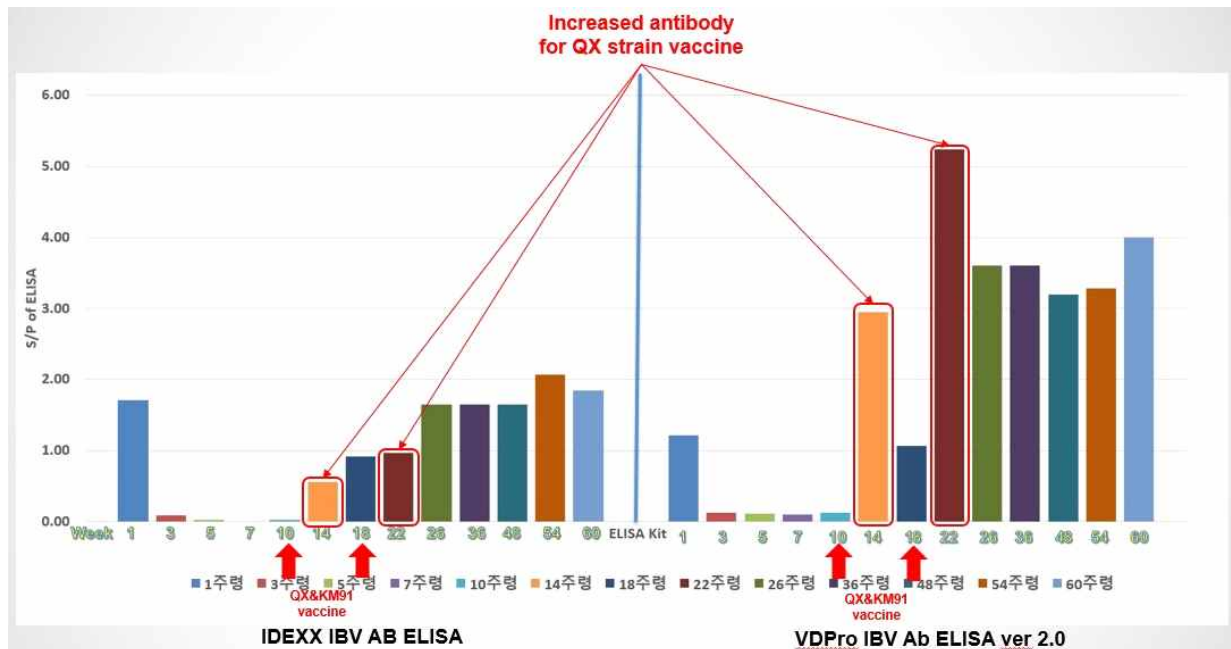
- 닭에 발생하는 대표적인 질병들 (AIV, NDV, MG, MS)에 대한 항체에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트의 반응성을 평가한 결과, 모든 시료에서 음성으로 나와 다른 질병들에 대한 항체와의 교차반응성은 없는 것으로 확인되어 IBV 변이주 (QX-type)에 대한 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

④ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (야외 백신 시료)

- 야외 농장에서 병아리 (1일령) 때부터 IBV strain별 백신을 일령별로 한 닭을 대상으로 특정 주차(1주, 3주, 5주, 7주, 10주, 14주, 18주, 22주, 26주, 36주, 48주, 54주, 60주)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였고 그룹당 10개의 검체를 이용하였으며, ELISA는 Indirect ELISA 방식으로 설정하였으며, Anti-chicken IgG HRP conjugate와 TMB Substrate를 이용하여 검체 희석 1/500으로 하여 상온에서 30분씩 각각 반응시키고 TMB Substrate 반응시간은 상온 15분 후 반응 정지시키는 방법으로 실시하였음. 시험결과 자료는 각각 개체단위로 실험하였으나 시험결과 데이터는 각 그룹의 ELISA 평균 S/P값 (Sample OD값/Positive control OD값)으로 표현하였음

<표 7> 야외농장 시료에 대한 백신 일정

백신일령	백신 종류	Strain	백신경로
1일령 (1주차)	생독	KM91	분무
20일령 (3주차)	생독	KM91	분무
30일령 (4주차)	생독	M41	분무
55일령 (8주차)	생독	KM91	분무
70일령 (10주차)	사독	KM91, QX	근육
100일령 (15주차)	생독	M41	분무
127일령 (19주차)	사독	KM91, QX	근육
140일령 (20주차)	생독	KM91	분무

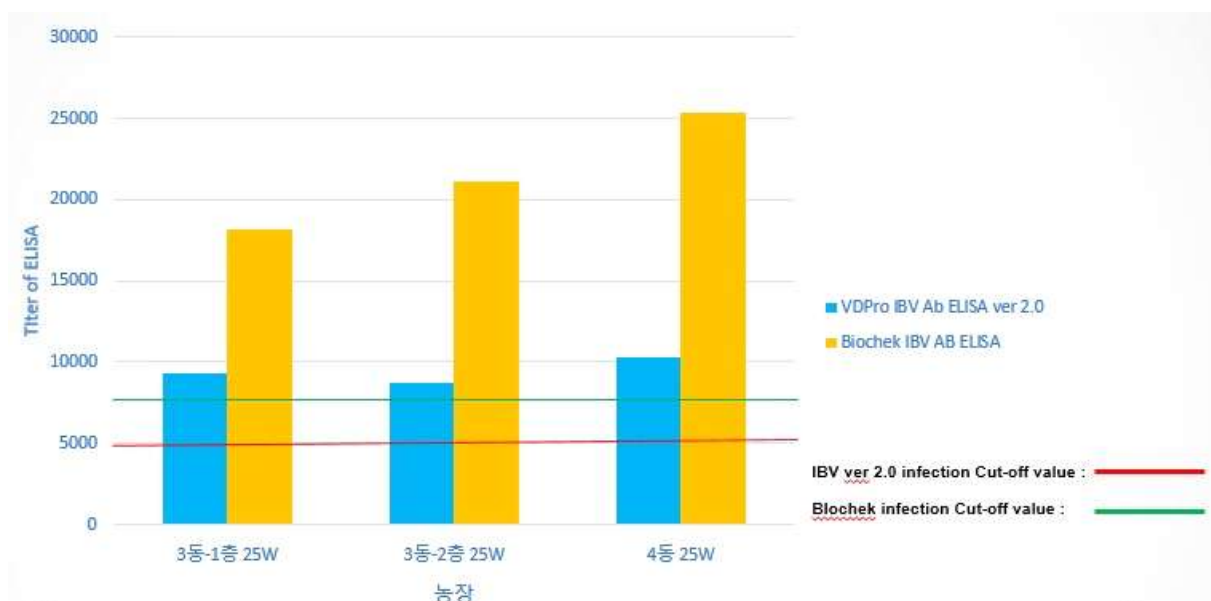


<그림 25> 야외 백신 시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트는 타사키트(IDEXX사) 대비 QX strain을 접종한 뒤 채취한 14주차 이상의 검체 그룹에서 QX strain 2차 접종 전인 18주차 검체 그룹을 제외하고 1.0 이상의 S/P값 차이를 보이는 월등한 반응성을 나타내었음
- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트는 이전 시험 시료와 마찬가지로 QX strain을 접종한 뒤 채취한 14주차 이상의 검체 그룹 (18주차 검체 그룹을 제외; QX strain 1차 접종 후 8주 후이기 때문에 항체 역가가 꾸준히 유지되지 않아 낮은 반응성을 보이는 것으로 사료됨)과 그 이전 검체그룹 사이에 반응성 차이가 1.5 S/P값을 기준으로 나뉠 수 있는 결과로써 현존하는 진단키트에 비해 IBV 변이주 (QX-type)를 보다 잘 진단할 수 있는 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

⑤ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (야외 감염 시료)

- 야외 농장에서 임상적, 실험적으로 확인된 감염 개체들의 시료를 얻기 어려운 점이 있는 바, 임의적으로 시판되고 있는 타사키트에서 역가시험 결과 높은 역가를 나타내는 시료를 감염시료로 설정하여 사용하였으며, 그룹당 10개의 검체를 이용하였다. 또한 타사키트와 IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트의 감염 역가 기준은 임의적으로 타사키트 (ELISA Titer 8000), IBV Ab ELISA ver 2.0 (ELISA Titer 5000)으로 정하여 비교하였다.



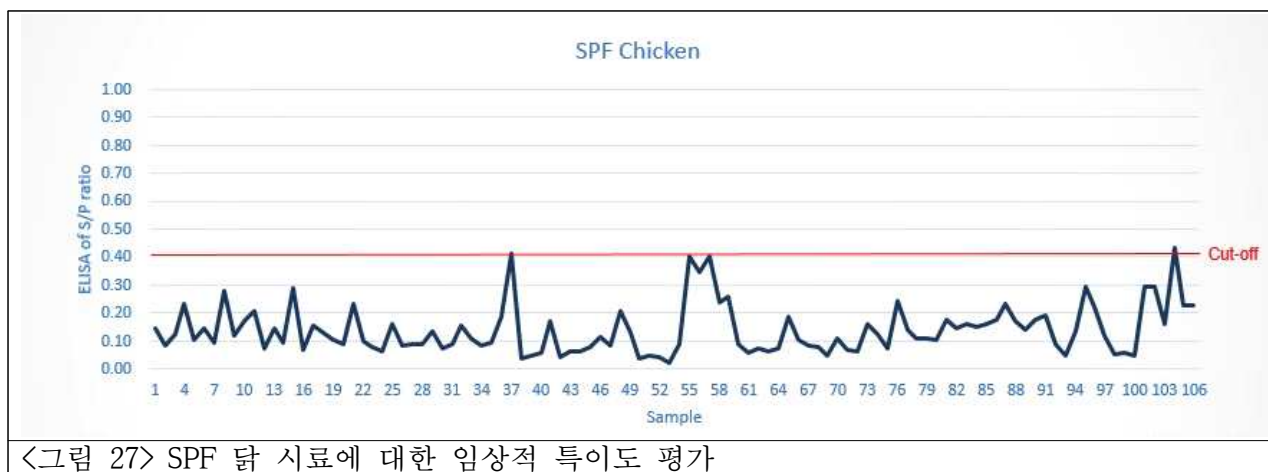
<그림 26> 야외 감염시료에 대한 IBV 변이주 (QX-type) 진단키트 평가

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트는 타사키트(Biochek사) 대비 야외 감염시료에 대해 반응성이 크지는 않으나 임의적으로 정한 감염 역가 기준 (타사키트 : 8000, IBV Ab ELISA ver 2.0 : 5000) 보다는 높은 반응성을 보이고 있어서 IBV 감염을 진단할 수 있는 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보이고 있으며, 임상적, 실험적으로 확인된 감염 시료들이 아니기 때문에 어떤 strain이 감염되었는지 혹은 감염진위 여부를 확인할 수 없는 점을 고려해서

박야 함

⑥ 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 변이주 진단키트 평가 (SPF 닭 시료)

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트의 임상적 특이도를 확인하기 위해 야외 계군에서 IBV 백신 미접종 계군의 혈액을 채취하기 어려운 부분이 있어 대신 IBV 음성인 SPF 닭에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 검체로 이용하였음 (n=106).



<그림 27> SPF 닭 시료에 대한 임상적 특이도 평가

- IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트의 임상적 특이도를 SPF 닭 시료(n=106)로 평가한 결과, 대부분의 시료에서 S/P값 0.4 이하로 나와 (특이도 96.2%) 임상적 특이도가 좋은 편으로 확인되어 IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임
- 상기 결과들을 토대로 제품 허가 완료된 상태임 [허가연도(2019년 12월), 제품명(VDPro IBV Ab ELISA ver 2.0), 허가번호(제121-108호)]


제 121 - 108 호

동물용의약품등 제조 수입 품목 허가증

1. 업 체 명 : (주)메디안디노스탁
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 고위형성동물전염병면역검사시약(VDPro IBV Ab ELISA ver 2.0, 수출용)[3]
4. 구 분 : 동물용의료기기
5. 허 가 조 건 : _
6. 허가번호 : 제 121 - 108 호
7. 최초 허가 연월일 : 2019.12.31
8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가 (조건부허가)합니다.

2019 년 12 월 31 일

농림축산검역본부장 

<그림 28> VDPro IBV Ab ELISA ver 2.0에 대한 품목허가증



<그림 29> IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트 제품 사진 (VPro IBV Ab ELISA ver 2.0)

<표 8> VPro IBV Ab ELISA ver 2.0 구성품

번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	IBV Antigen Coated Plate	5장	방습제를 포함하고 파우치 포장으로 이루어진 96-well plate
2	10X Washing Buffer	단일	무색 투명한 액체
3	Dilution Buffer	단일	적색 투명한 액체
4	Positive Control	단일	적색의 액체
5	Negative Control	단일	청색의 액체
6	HRPO Anti-Chicken IgG Conjugate	단일	청녹색의 액체
7	TMB Substrate	단일	무색 투명한 액체
8	Stop Solution	단일	무색 투명한 액체

QUICK PROTOCOL



<그림 30> IBV 변이주 (QX-type) 진단 키트 제품 시험방법 (VDPro IBV Ab ELISA ver 2.0)

2. 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 개발 (주관연구기관 : ㈜메디안디노스틱)

가. 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) 항체 측정용 ELISA를 위한 원료물질 개발

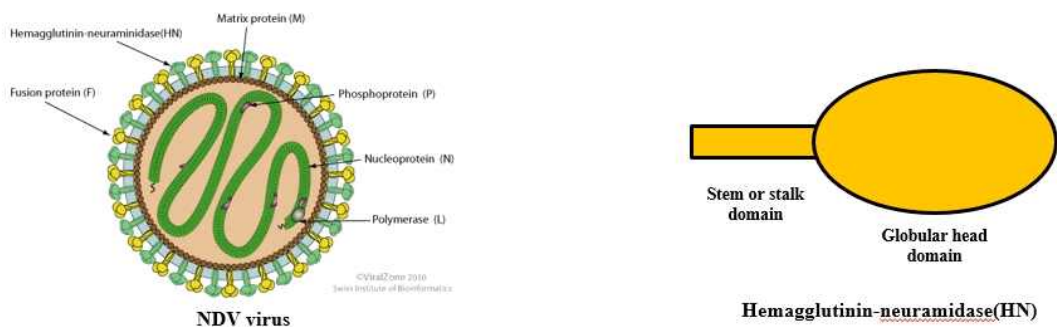
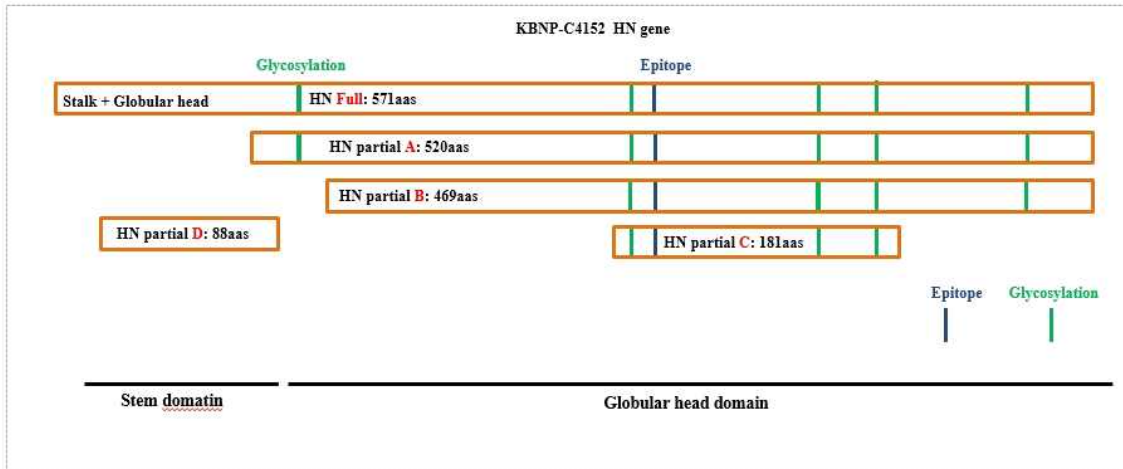
(1) NDV genotype 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 개발

○ 본 연구에서는 NDV (VII) 등 국내 백신주의 항원성 및 중화 epitope 분석하고 NDV (VII)의 *E.coli* & Baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 (HN, Fusion) 제작과 NDV (II) & (VII) 불활화항원 농축 및 정제 시스템을 확립하였음. 확립 후 평가한 단백질은 아래와 같음.

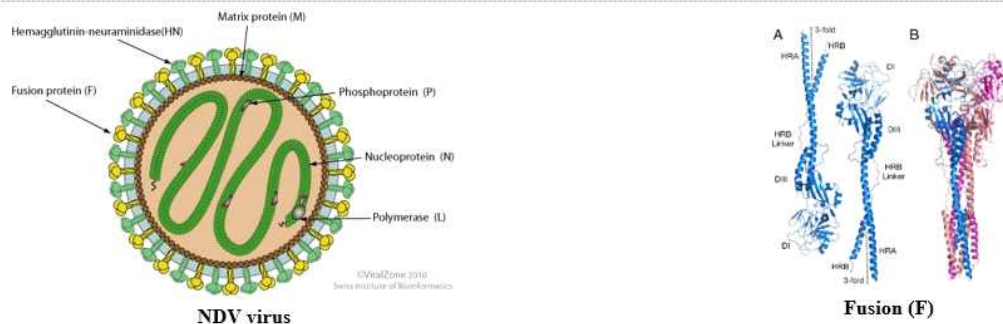
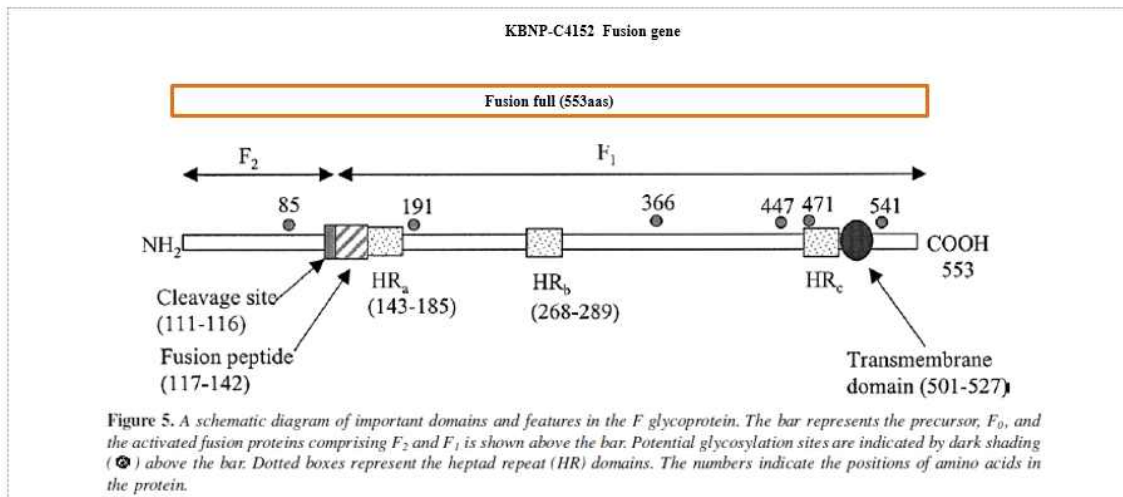
- NDV (II) & (VII) 불활화항원
- NDV (VII) pET21a-HN full (BL21 DE3), NDV (VII) Baculovirus-HN full
- NDV (VII) pET21a-HN partial (A,C,D)
- NDV (VII) pET21a-Fusion full (Codon+, DE3), NDV (VII) Baculovirus-Fusion full

(가) NDV (VII) 개발전략

- NDV (VIIQX-type) *E.coli* 재조합단백질 (HN, Fusion)과 불활화항원을 제작하여 진단용 원료물질의 가능성을 확인하였고 NDV (VII)의 항원성 및 중화 epitope 분석하여 진단용 원료물질의 가능성 테스트 하였음
- 평가결과 NDV (II) & (VII) 불활화항원이 진단용 원료물질의 가능성 확인하였으며, NDV (VII)의 *E.coli* & Baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 (HN, Fusion)은 진단용 원료물질로 적합하지 않았음



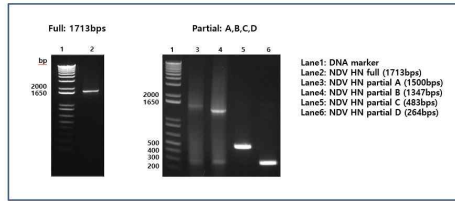
<그림 31> NDV (VII) 재조합단백질 (HN) 개발 전략



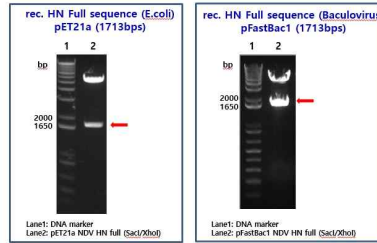
<그림 32> NDV (VII) 재조합단백질 (Fusion) 개발 전략

○ NDV (VII) 재조합단백질 (HN) 제작

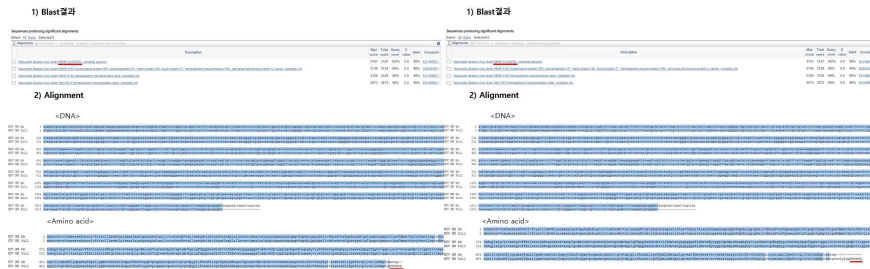
1. Gene 확보 (RNA preparation → cDNA synthesis → PCR)



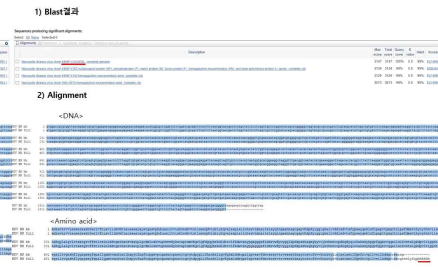
2. Cloning (full)



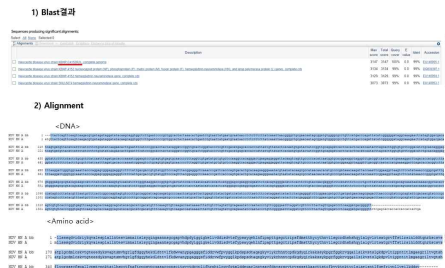
3. Sequencing (full-pET21a)



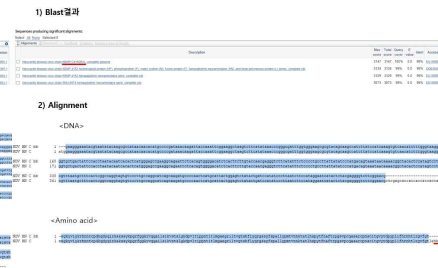
3. Sequencing (full-pFastBac1)



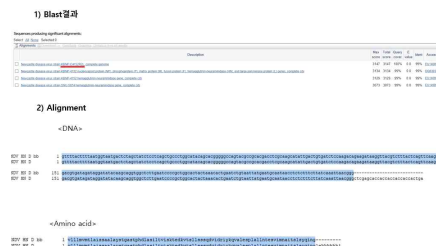
3. Sequencing (Partial A-pET21a)



3. Sequencing (Partial C-pET32a)

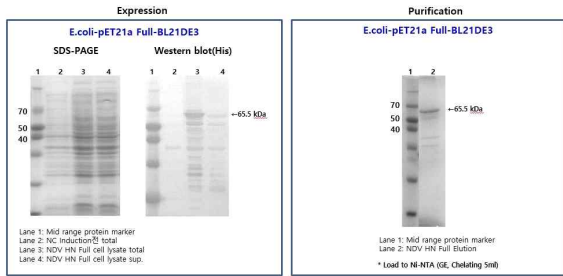


3. Sequencing (Partial D-pET32a)

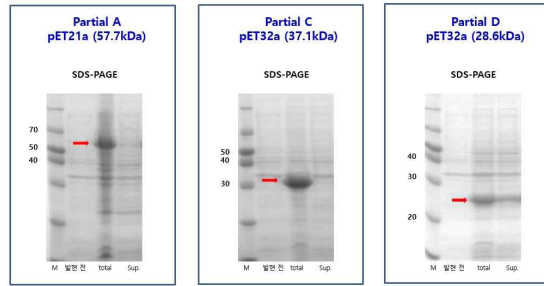


<그림 33> NDV (VII) 재조합단백질 (HN) 제작

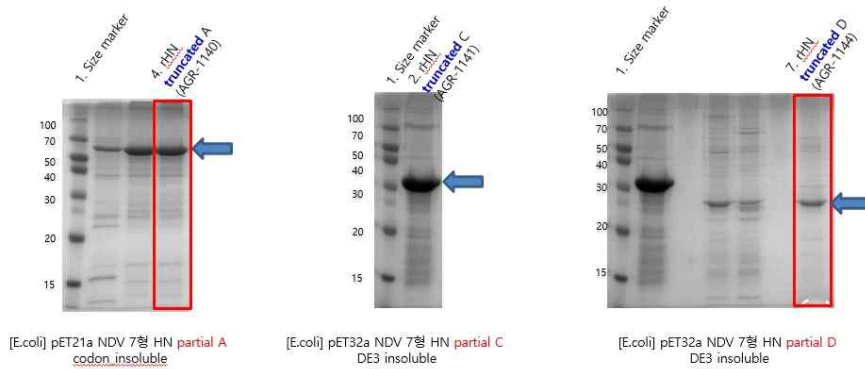
4. Expression (rec. HN Full (E.coli))



4. Expression (rec. HN partial (E.coli))

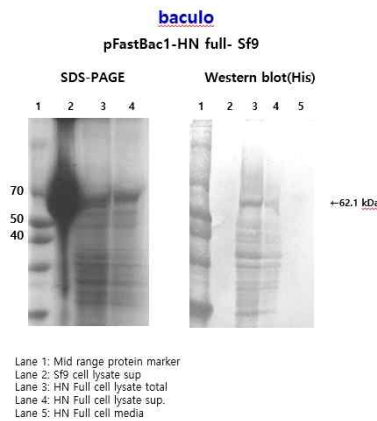


Purification (recombinant HN truncated E.coli)



<그림 34> NDV (VII) *E. coli* 재조합단백질 (HN) 발현 및 정제

2. Expression (HN Full)

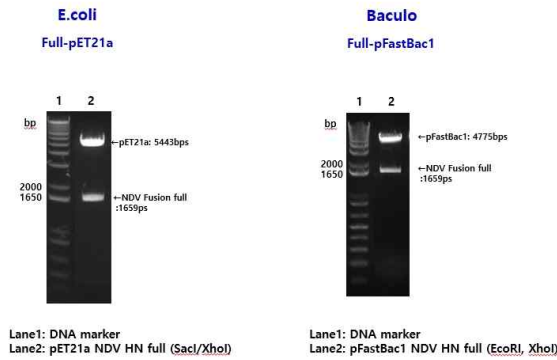


<그림 35> NDV (VII) Baculovirus 재조합단백질 (HN) 발현 및 정제

- NDV (VII) *E.coli* 재조합단백질 (HN) B의 경우, 단백질 발현이 되지 않아 항원성을 규명하기 위한 테스트는 하지 못했음
- NDV (VII)의 *E.coli* & Baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 (HN)의 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과, 모든 항원이 반응성이 진단용 원료로 사용하기에 안 좋은 것을 확인하였음 (결과 미 첨부).

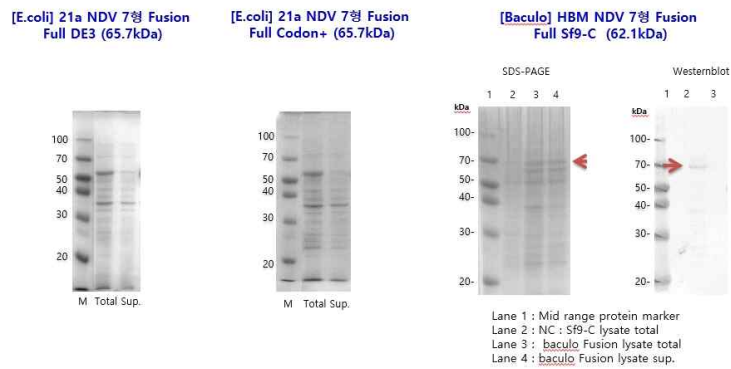
○ NDV (VII) 재조합단백질 (Fusion) 제작

Fusion Cloning (full)

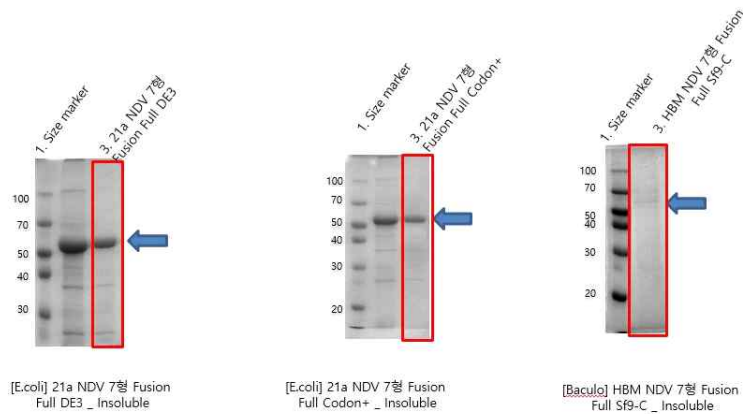


<그림 36> NDV (VII) 재조합단백질 (Fusion) 제작

Fusion Expression



purification (Fusion Full)

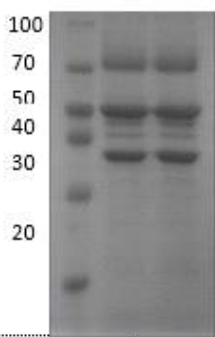


<그림 37> NDV (VII) 재조합단백질 (Fusion) 발현 및 정제

- NDV (VII)의 *E.coli* & Baculovirus expression system을 이용한 재조합단백질 (Fusion)의 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과, 모든 항원이 반응성이 진단용 원료로 사용하기에 안 좋은 것을 확인하였음 (결과 미 첨부).

○ NDV (II) & (VII) 불활화 항원 제작 (농축 및 정제)

- 진단 ELISA kit의 항원으로 평가 및 항체 제작을 위한 면역원으로 사용하기 위하여 불활화 virus 농축/정제 시스템을 이용하여 항원을 제작하였음
- 불활화 virus 농축/정제 시스템은 정제 순도는 SDS-PAGE 상에서 확인하였음

공정 기록서				
		일시	공정	
종란입고	입고	2016-10-13~	SPF egg 300개 입고	
	배양		온도 37°C / 습도 50% 유지	
접종	접종	2016-10-24	12일령 접종	
	바이러스 회석		10 ^{6.3}	
	기실체크		기실부위 체크 후, egg당 200ul씩 접종	
수확	Chilling	2016-10-27	4°C 냉장참고	
	수확	2016-10-28~	요막강액 수확 (2L)	
	원심분리		8000rpm, 20min, 4°C	
	필터		멸균거즈필터	
여과평가	HA 역가 검사			
보관	보관		4°C 냉장참고 보관	
공정(원심)	초원심	2016-11-01~	60000g, 2hr, 4°C (45TI) 30% sucrose 5ml + sample 30ml 초원심 후, pellet을 TNE bf에 부유 (80ml)	
	균질화 및 Sucrose gradient		Sonication (10min, 10sec, 10 hold) sucrose 50%, 40%, 30% + sample 20000g, 3hr, 4°C	
	sucrose 제거		1X PBS 투석	
원료검사	BCA정량		37°C, 30min, 562nm 1.7mg/ml x 72ml = 122.4mg	
	SDS-PAGE			1. Marker 2. AGG-285 3. AGG-346
	ELISA	2016-11-30	NDV AB EISA, 450nm	

<그림 38> NDV (II) 불활화 항원 정제 과정 및 정제 확인

공정 기록서			
		일시	공정
종란입고	입고	2019-06-18	SPF egg 300개 입고
	배양		온도 37°C / 습도 50% 유지
접종	접종	2019-06-27	11일령 접종
	바이러스 회석		10 ^{6.3}
	기실체크		기실부위 체크 후, egg당 200ul씩 접종
수확	Chilling	2019-06-30	4°C 냉장창고
	수확	2019-07-01	요락강액 수확 (2L)
	원심분리		8000rpm, 20min, 4°C
	필터		멤브레인필터
역가평가	HA 역가 검사		
보관	보관		4°C 냉장창고 보관
공정(원심)	초원심	2019-07-02~	60000g, 2hr, 4°C (45TI) 30% sucrose 5ml + sample 30ml 초원심 후, pellet을 TNE bf에 부유 (24ml)
	균질화 및 Sucrose gradient		1. Sonication (10min, 10sec, 10 hold) sucrose 50%, 40%, 30% + sample 20000g, 3hr, 4°C 2. No Sonication sucrose 50%, 40%, 30% + sample 20000g, 3hr, 4°C
	sucrose 제거		1X PBS 투석
원료검사	BCA정량		37°C, 30min, 562nm
	SDS-PAGE		
ELISA	2019-07-01	NDV AB EISA, 450nm	Sonication(O) : 1.98 mg Sonication(X) : 6.62 mg

<그림 39> NDV (VII) 불활화 항원 정제 과정 및 정제 확인

(나) NDV (II) & (VII) 항체측정용 ELISA를 위한 진단용 원료물질 제작 (항체)

- NDV (II) & (VII) 혈청형에 대한 진단 ELISA kit를 개발하기 위하여 불활화항원 농축/정제 시스템을 이용한 항원을 개발 및 제작하여 진단 ELISA kit의 항원으로 평가한 뒤 항체 제작을 위한 면역원으로 사용하였음

(나-1) NDV (II) & (VII) 특이 단클론항체 제작

○ NDV (II) & (VII) 불활화항원을 이용한 단클론항체 제작

- NDV (II) & (VII) 불활화항원을 면역원으로 Balb/c mouse에 4차 면역 후 혈청 내 존재하는 antibody titration 실시
[NDV (II) & (VII) 불활화항원을 1ug/ml의 농도로 96well plate에 coating하여 혈청 내 항체 확인]
- NDV (II) & (VII) 불활화항원으로 면역화된 Balb/c mouse로부터 비장(spleen)을 적출하여 myeloma cell (SP2/0-AG14) 과 fusion 하였으며, HAT selection 후 cloning 실시
- Cloning 후 단클론항체 스크린 시, NDV (II) & (VII) 불활화항원을 coating 항원으로 이용한 ELISA 방법으로 NDV (II) & (VII) 특이적인 단클론항체를 선발하였음
: 결과 총 10종의 NDV (II) 특이적인 단클론항체와 총 5종의 NDV (VII) 특이적인 단클론항체를 확보하였음.
- 선발된 15종의 단클론항체의 Isotype를 확인하기 위하여 Isotyping kit (Zymed, USA)를 사용하여 항체의 특성을 분석

<표 9> NDV (II) & (VII) 불활화항원 단클론항체 screening 및 isotyping 검사결과

Coating Antigen	농축 정제된 NDV (VII)	농축 정제된 NDV (II)	Isotype
mAb clone	O.D ₄₅₀	O.D ₄₅₀	
9C43	0.05	1.77	IgG3,G1
9C24	0.06	1.64	G1,2a,G3
9C28	0.05	1.54	G1,2a,G3
5H63	0.05	1.35	IgG1
5H71	0.05	1.32	IgG1,2a
1A70	0.05	1.56	IgG1
1A82	0.16	0.41	IgG1
11A51	0.05	1.30	IgG1
11A52	0.05	0.98	IgG1,2b
6A16	0.15	0.15	IgG2a,G3
2E35	0.60	0.06	IgM
2E40	0.59	0.05	IgM
2E2	0.62	0.05	IgM
2E14	0.52	0.05	IgM

2E17	0.52	0.05	IgM
------	------	------	-----

- 선발된 15종의 단클론항체의 마우스 복수를 생산하여 column을 이용하여 정제하여 테스트에 이용함
- 선발된 15종의 정제된 단클론항체는 재조합단백질 (HN & Fusion)과 불활화항원으로 진단용 원료물질의 성능평가를 진행한 결과, 모든 단클론항체가 진단용 원료로 사용하기에 안 좋은 것을 확인하였음 (결과 미 첨부).

(다) 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 개발

○ 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 유효성 평가

- NDV (II) & (VII) 혈청형에 대한 진단 ELISA kit의 유효성을 평가하기 위해서 NDV (II) & (VII) 백신 접종 실험 시료 및 야외 시료를 대상으로 기존 ELISA kit와의 항체 검출능 비교 시험을 실시하였음
- 현존하는 진단키트에 비해 NDV (II) & (VII) 혈청형을 보다 잘 진단할 수 있는 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보인 NDV (II) & (VII) 불활화항원 조합의 진단키트가 NDV (II) & (VII) 혈청형 진단키트로써 가능성이 제일 높아보여 최종 평가에 사용하였음

① 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 평가 (LOD Test)

- SPF 닭에 NDV (II) [Lasota strain]과 NDV (VII) [KBNP-C4152R2L strain]이 포함된 국내 백신을 각각 그룹당 접종한 뒤 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였음
- 병원체가 접종되지 않은 SPF 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 음성 시료에 NDV 백신 혈청들을 2진 희석하여 LOD (Limit of Detection) 측정에 희석시료로 사용하였음
- 각각의 희석시료들은 각각의 접종된 NDV 백신주로 HI test를 진행하였음

Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type II Anti-serum_1	2 ⁹	Cal. 4	2.72	21950.3	P	1.38	6478.1	P
	2 ⁸	Cal. 5	2.57	19878.9	P	1.05	3959.7	P
	2 ⁷	Cal. 6	2.51	19075.6	P	0.93	3205.8	P
	2 ⁶	Cal. 7	1.66	9017.5	P	0.57	836.1	P
	2 ⁵	Cal. 8	1.18	4897.9	P	0.44	1299.7	P
	2 ⁴	Cal. 9	0.89	2969.7	P	0.20	177.3	N
	2 ³	Cal. 10	0.73	2078.1	P	0.19	198.6	N
	2 ²	Cal. 11	0.48	979.5	P	0.11	72.5	N

Sample	Dilution fold
Cal. 4	1/8
Cal. 5	1/16
Cal. 6	1/32
Cal. 7	1/64
Cal. 8	1/128
Cal. 9	1/256
Cal. 10	1/512
Cal. 11	1/1024

Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type II Anti-serum_2	2 ⁸	Cal. 4	3.02	26597.3	P	1.46	7171.4	P
	2 ⁷	Cal. 5	2.57	19807.2	P	0.97	3426.8	P
	2 ⁶	Cal. 6	1.94	11977.5	P	0.58	1357.3	P
	2 ⁵	Cal. 7	1.12	4482.9	P	0.20	197.0	N
	2 ⁴	Cal. 8	0.22	230.3	P	-0.03	0	N
	2 ³	Cal. 9	0.10	0	N	-0.09	0	N
	2 ²	Cal. 10	0.08	58.7	N	-0.04	0	N
	2 ¹	Cal. 11	-0.10	34.6	N	-0.04	0	N

Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type II Anti-serum_3	2 ⁹	Cal. 4	2.98	25907.7	P	1.53	7776.4	P
	2 ⁸	Cal. 5	2.36	17067.7	P	0.94	3227.5	P
	2 ⁷	Cal. 6	1.99	12575.6	P	0.74	2124.6	P
	2 ⁶	Cal. 7	1.16	4764.1	P	0.26	313.0	P
	2 ⁵	Cal. 8	0.87	2805.0	P	0.13	98.8	N
	2 ⁴	Cal. 9	0.41	732.0	P	0.04	10.9	N
	2 ³	Cal. 10	0.21	211.7	P	-0.02	0	N
	2 ²	Cal. 11	0.06	22.2	N	-0.04	0	N

<그림 40> NDV (II) 국내 백신시료에 대한 분석적 민감도 평가

Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type VII Anti-serum_1	2 ⁸	Cal. 4	3.57	35868.8	P	1.81	10522.0	P
	2 ⁷	Cal. 5	3.24	30101.1	P	1.34	6118.0	P
	2 ⁶	Cal. 6	2.55	19579.1	P	0.88	2857.2	P
	2 ⁵	Cal. 7	2.06	13306.3	P	0.52	1102.6	P
	2 ⁴	Cal. 8	1.34	6133.3	P	0.25	294.2	P
	2 ³	Cal. 9	0.75	2168.0	P	0.10	57.9	N
	2 ²	Cal. 10	0.48	958.1	P	0.02	3.3	N
	2 ¹	Cal. 11	0.24	274.3	P	-0.02	0	N

Sample	Sample Dilution fold
Cal. 4	1/8
Cal. 5	1/16
Cal. 6	1/32
Cal. 7	1/64
Cal. 8	1/128
Cal. 9	1/256
Cal. 10	1/512
Cal. 11	1/1024

Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type VII Anti-serum_2	2 ⁹	Cal. 4	3.24	30120.3	P	1.64	8855.4	P
	2 ⁸	Cal. 5	2.70	21734.2	P	1.12	4478.5	P
	2 ⁷	Cal. 6	2.14	14305.5	P	0.72	2016.0	P
	2 ⁶	Cal. 7	1.95	12028.5	P	0.52	1104.3	P
	2 ⁵	Cal. 8	1.69	9291.3	P	0.43	786.5	P
	2 ⁴	Cal. 9	0.66	1712.0	P	0.09	44.8	N
	2 ³	Cal. 10	0.39	653.2	P	0.02	4.3	N
	2 ²	Cal. 11	0.29	395.6	P	0.01	1.8	N

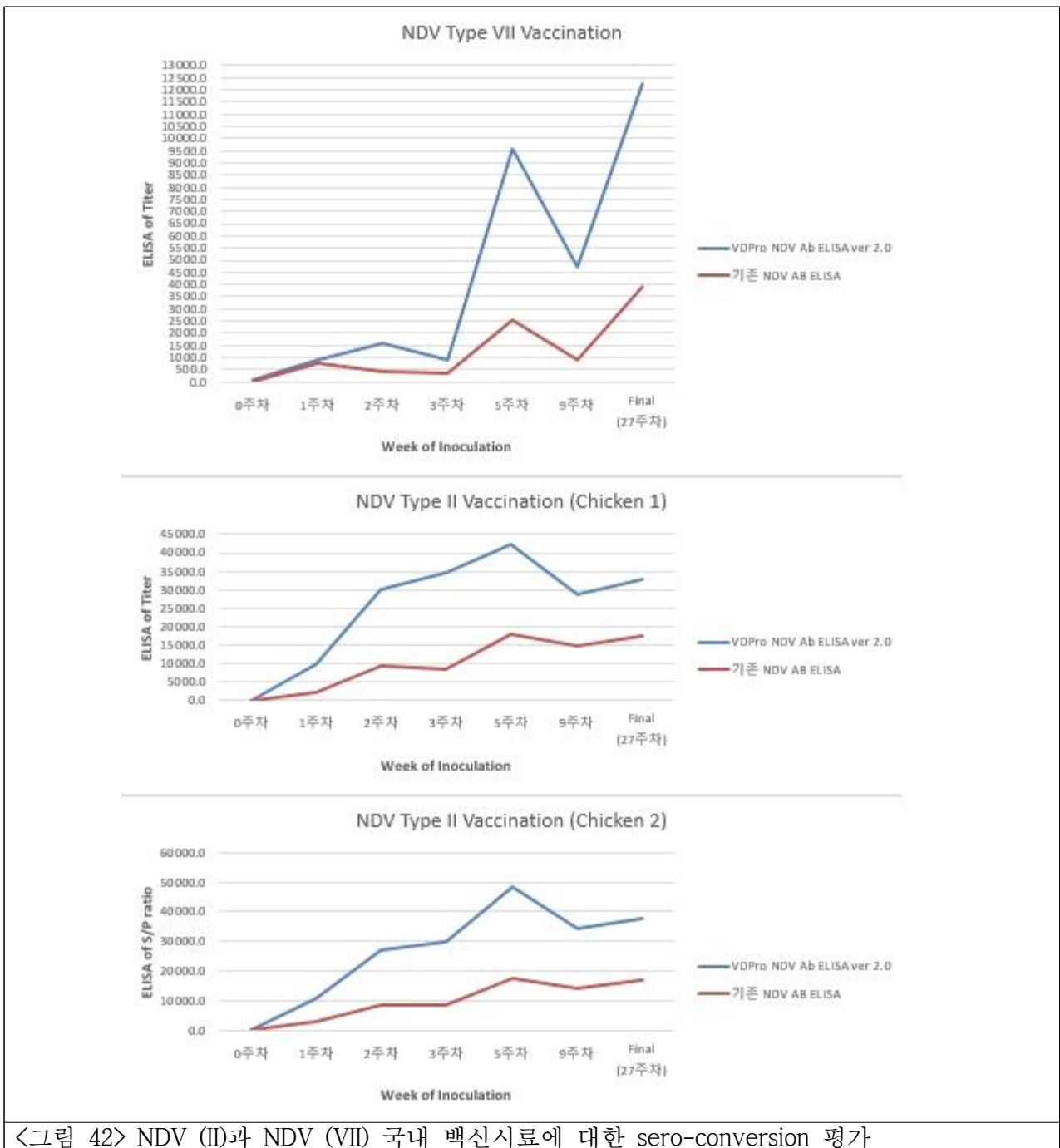
Sample Group	Sample		VDPrep NDV Ab ELISA ver.2.0			기존 NDV AB ELISA		
	HI Titer	No.	S/P	Titer	판정	S/P	Titer	판정
NDV Type VII Anti-serum_3	2 ⁸	Cal. 4	3.39	32630.3	P	1.59	8373.3	P
	2 ⁷	Cal. 5	2.92	25058.0	P	1.17	4852.8	P
	2 ⁶	Cal. 6	2.15	14393.4	P	0.72	2022.3	P
	2 ⁵	Cal. 7	1.76	10045.9	P	0.33	500.5	P
	2 ⁴	Cal. 8	1.15	4638.2	P	0.23	248.7	P
	2 ³	Cal. 9	0.67	1765.9	P	0.08	39.0	N
	2 ²	Cal. 10	0.38	634.9	P	0.01	0.8	N
	2 ¹	Cal. 11	0.27	344.4	P	0.01	0.8	N

<그림 41> NDV (VII) 국내 백신시료에 대한 분석적 민감도 평가

- NDV (II)과 NDV (VII) 국내 백신시료에 대한 진단 민감도 개선 NDV ELISA 키트의 분석적 민감도를 평가한 결과, 모든 NDV (II)과 NDV (VII) 국내 백신시료에서 기존 NDV ELISA 키트보다 민감한 것으로 확인되어 진단 민감도가 개선된 NDV 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

② 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 평가 (sero-conversion)

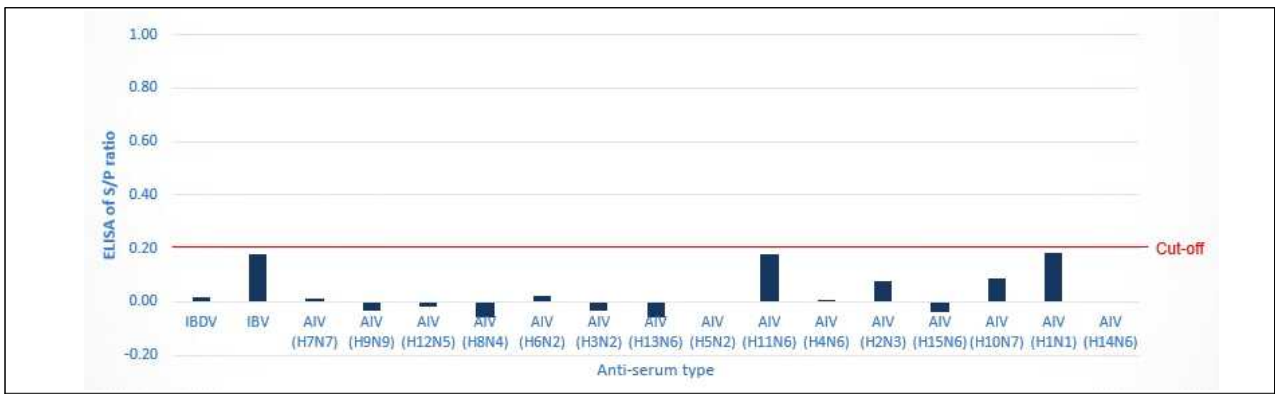
- SPF 닭에 NDV (II) [Lasota strain]과 NDV (VII) [KBNP-C4152R2L strain]이 포함된 국내 백신을 각각 그룹당 접종한 뒤 접종 전, 접종 후 1주일, 접종 후 2주일, 접종 후 3주일, 접종 후 5주일, 접종 후 9주일, 접종 후 27주일에 각각의 닭의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였음



- NDV (II)과 NDV (VII) 국내 백신시료에 대한 진단 민감도 개선 NDV ELISA 키트의 sero-conversion 반응성을 평가한 결과, 모든 주치의 NDV (II)과 NDV (VII) 국내 백신시료에서 기존 NDV ELISA 키트보다 민감한 것으로 확인되어 진단 민감도가 개선된 NDV 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

③ 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 평가 (타질병 시료)

- 진단 민감도 개선 NDV ELISA의 특이도를 확인하기 위해 외국에서 구입한 항혈청 시료인 AIV 항혈청 (APHA사), IBV 항혈청 (Charles river사), IBDV 항혈청 (Charles river사)를 구입하여 시험 시료로 사용하였음



<그림 43> 타질병 시료에 대한 분석적 특이도 평가

- 닭에 발생하는 대표적인 질병들 (AIV, IBV, IBDV)에 대한 항체에 대한 진단 민감도 개선 NDV ELISA 키트의 분석적 특이도를 평가한 결과, 모든 시료에서 S/P값 0.2 이하로 나와 다른 질병들에 대한 항체와의 교차반응성은 없는 것으로 확인되어 진단 민감도가 개선된 NDV 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

④ 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 평가 (야외 시료)

- 진단 민감도 개선 NDV ELISA의 임상적 민감도를 확인하기 위해 육계 야외 농장에서 NDV 백신이 접종된 계군의 혈액을 도계장에서 채취하여 혈청을 분리한 후 시험 시료로 사용하였고 NDV (II) 백신 그룹은 그룹당 30개, NDV (VII) 백신 그룹은 그룹당 10개의 검체를 이용하였음

번호	축주명	농장명	주소	품종	채혈일자	검사일자	채혈장소	사육(출하)수	사용백신	접종주기	VDPro NDV Ab ELISA ver 2.0				기존 NDV AB ELISA			
											검사수	양성수	음성수	양성률	검사수	양성수	음성수	양성률
1	김병국	미리농장	경기도 파주시 파평면 배머리길 751-17	육계	17.07.04	17.07.06	(주)해마로	23,605	에비뉴 (메리알 코리아)	13일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
2	김광수	-	강원도 인제군 서화면 천도리 418	육계	17.07.05	17.07.06	(주)해마로	26,286	에비뉴 (메리알 코리아)	12~14일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
3	차시현	-	강원도 양구군 동면 원당길 506-1	육계	17.07.12	17.07.13	(주)해마로	19,489	대성미생물 연구소	12일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
4	안병직	영보농장	충남 보령시 청라면 상죽길 32-77	육계	17.07.12	17.07.13	(주)해마로	14,081	에비뉴 (메리알 코리아)	14일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
5	이한우	후곡양계장	강원도 양구군 동면 숲골로 164-25	육계	17.07.13	17.07.13	(주)해마로	26,277	PRO-VAC (코미팜)	9~13일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
6	장동희	근성농장	경기도 양주시 만송로 366번길 139	육계	17.07.18	17.07.21	(주)해마로	8,341	에비뉴 (메리알 코리아)	12일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
7	김창현	-	경기도 파주시 문산읍 장산로 76번길 14-179	육계	17.07.19	17.07.21	(주)해마로	7,405	에비뉴 (메리알 코리아)	5~6일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
8	정동일	부림농장	강원도 춘천시 동산면 구절산길 24-53	육계	17.07.20	17.07.21	(주)해마로	14,641	에비뉴 (메리알 코리아)	14일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%
9	신동숙	은금농장	강원도 화천군 상서면 다파로 404-100	육계	17.07.20	17.07.24	(주)해마로	19,435	에비뉴 (메리알 코리아)	13~14일령 1회	30	1	29	3%	30	0	30	0%
10	정동일	부림농장	강원도 홍천군 북방면 부사원길 17	육계	17.07.26	17.07.27	(주)해마로	13,469	에비뉴 (메리알 코리아)	14일령 1회	30	30	0	100%	30	30	0	100%

<그림 44> NDV (II) 백신 야외시료(육계)에 대한 임상적 민감도 평가

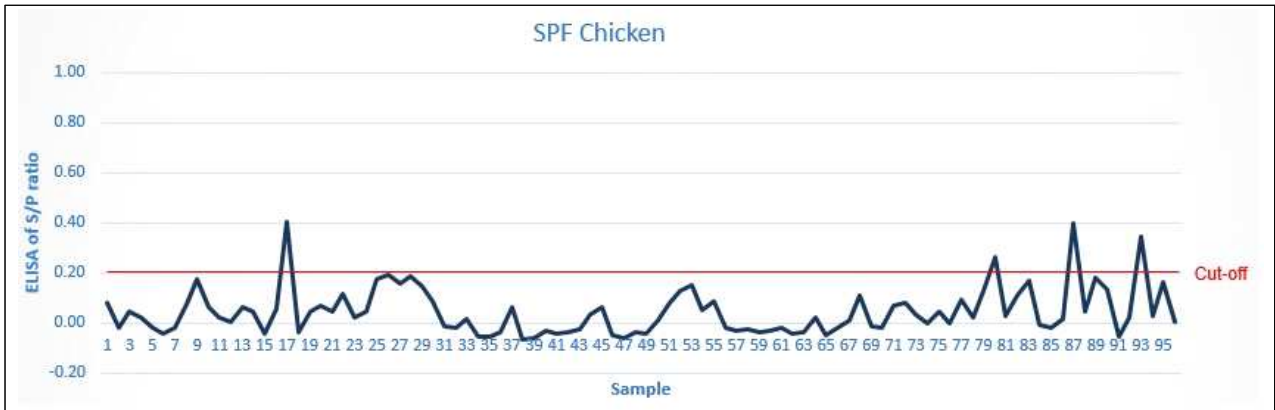
번호	Sample	HI Titer 평균	MDPro NDV Ab ELISA ver 2.0				기존 NDV AB ELISA				번호	Sample	HI Titer 평균	MDPro NDV Ab ELISA ver 2.0				기존 NDV AB ELISA			
			검사수	양성수	음성수	양성률	검사수	양성수	음성수	양성률				검사수	양성수	음성수	양성률	검사수	양성수	음성수	양성률
1	17-48	7,1±0,7	10	10	0	100%	10	10	0	100%	14	17-79 (1호사)	5,8±1,3	10	10	0	100%	10	10	0	100%
2	17-51	3,3±0,6	10	6	4	60%	10	1	9	10%	15	17-81 (1호사)	7,6±0,5	10	10	0	100%	10	10	0	100%
3	17-55	8,0±0,0	10	10	0	100%	10	10	0	100%	16	17-81 (2호사)	6,8±0,8	10	10	0	100%	10	10	0	100%
4	17-56	7,9±0,3	10	10	0	100%	10	10	0	100%	17	17-83	7,5±0,5	10	10	0	100%	10	10	0	100%
5	17-61	4,9±2,2	10	10	0	100%	10	9	1	90%	18	17-87	4,5±0,5	10	10	0	100%	10	10	0	100%
6	17-62	7,2±1,0	10	10	0	100%	10	10	0	100%	19	17-88 (1등)	7,9±0,3	10	10	0	100%	10	10	0	100%
7	17-66	7,6±0,7	10	10	0	100%	10	10	0	100%	20	17-88 (2등)	7,4±0,8	10	10	0	100%	10	10	0	100%
8	17-68	7,5±0,5	10	10	0	100%	10	10	0	100%	21	17-88 (3등)	7,8±0,4	10	10	0	100%	10	10	0	100%
9	17-70	7,1±0,3	10	10	0	100%	10	10	0	100%	22	17-95	1,5±0,7	10	2	8	20%	10	1	9	10%
10	17-74	8,0±0,0	10	10	0	100%	10	10	0	100%	23	17-96	7,0±0,7	10	10	0	100%	10	9	1	90%
11	17-75	7,7±0,7	10	10	0	100%	10	10	0	100%	24	17-97	6,5±1,2	10	10	0	100%	10	10	0	100%
12	17-78 (1호사)	4,5±1,1	10	10	0	100%	10	7	3	70%	25	17-98 (1등)	7,3±0,8	10	10	0	100%	10	10	0	100%
13	17-78 (4호사)	4,3±0,7	10	10	0	100%	10	7	3	70%	26	17-98 (4등)	8,0±0,0	10	10	0	100%	10	10	0	100%

<그림 45> NDV (VII) 백신 야외시료(육계)에 대한 임상적 민감도 평가

- 진단 민감도 개선 NDV ELISA 키트의 임상적 민감도를 NDV (II) 백신 그룹과 NDV (VII) 백신 그룹으로 평가한 결과, 모든 시료에서 기존 NDV ELISA 키트보다 양성률이 같거나 높은 것으로 확인되어 진단 민감도가 개선된 NDV 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임

④ 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA 평가 (SPF 닭 시료)

- 진단 민감도 개선 NDV ELISA의 임상적 특이도를 확인하기 위해 야외 계군에서 NDV 백신 미접종 계군의 혈액을 채취하기 어려운 부분이 있어 대신 NDV 음성인 SPF 닭에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 검체로 이용하였음 (n=96).



<그림 46> SPF 닭 시료에 대한 임상적 특이도 평가

- 진단 민감도 개선 NDV ELISA 키트의 임상적 특이도를 SPF 닭 시료(n=96)로 평가한 결과, 대부분의 시료에서 S/P값 0.2 이하로 나와 (특이도 95.8%) 임상적 특이도가 좋은 편으로 확인되어 진단 민감도가 개선된 NDV 항체 진단키트로써 사용될 수 있는 가능성을 보임
- 상기 결과들을 토대로 제품 허가 완료된 상태임 [허가연도(2020년 1월), 제품명(VDPro NDV Ab ELISA ver 2.0), 허가번호(제121-109호)]

제 121 - 109 호


동물용의약품등 제조
 수입

품목 허가증

1. 업 체 명 : (주)메디안디노스텍
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 인수공통전염병면역검사시약(VDPro NDV Ab ELISA ver 2.0, 수출용)[3]]
4. 구 분 : 동물용의료기기
5. 허 가 조 건 : _
6. 허가번호 : 제 121 - 109 호
7. 최초 허가연월일 : 2020.01.23
8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가 (조건부허가)합니다.

2020 년 01 월 23 일

농림축산검역본부장 

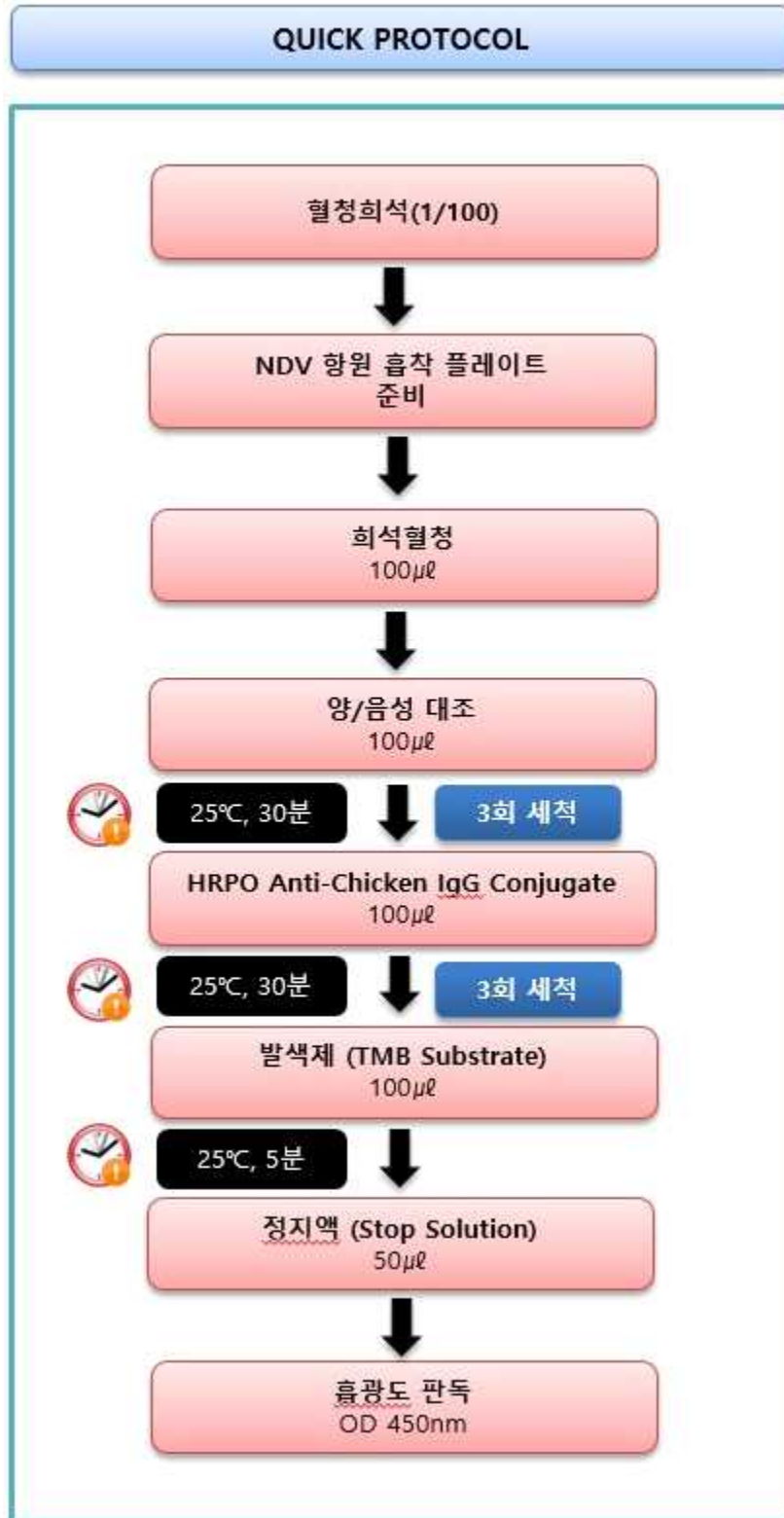
<그림 47> VDPro NDV Ab ELISA ver 2.0에 대한 품목허가증



<그림 48> 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) 진단 키트 제품 사진 (VDPPro NDV Ab ELISA ver 2.0)

<표 10> VDPPro NDV Ab ELISA ver 2.0 구성품

번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	NDV Antigen Coated Plate	5장	방습제를 포함하고 파우치 포장으로 이루어진 96-well plate
2	10X Washing Buffer	단일	무색 투명한 액체
3	Dilution Buffer	단일	적색 투명한 액체
4	Positive Control	단일	적색의 액체
5	Negative Control	단일	청색의 액체
6	HRPO Anti-Chicken IgG Conjugate	단일	청녹색의 액체
7	TMB Substrate	단일	무색 투명한 액체
8	Stop Solution	단일	무색 투명한 액체



<그림 49> 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) 진단 키트 제품 시험방법 (VDPro NDV Ab ELISA ver 2.0)

3. 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(뉴모바이러스, 닭전염성기관지염 바이러스)의 모니터링 시스템 개발 및 피해 현황 조사 (협동연구기관 : (주)카브)

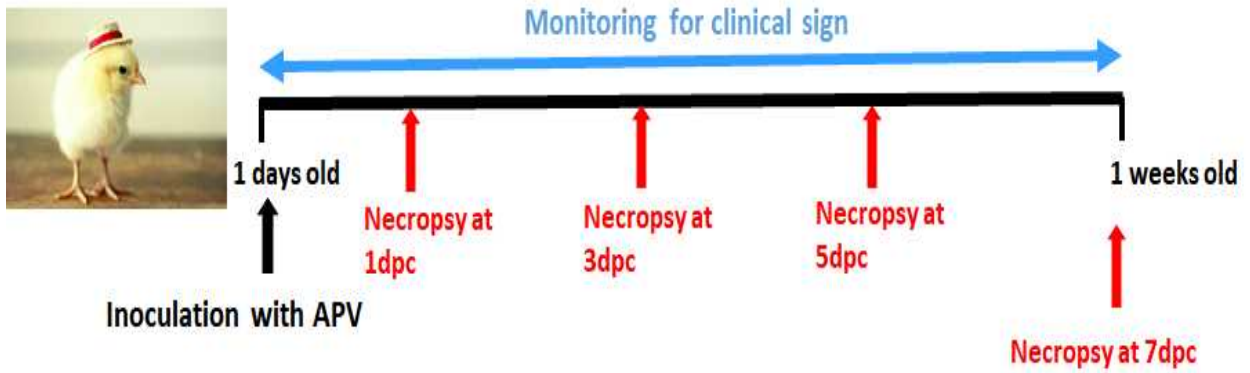
가. 닭 뉴모바이러스(aMPV) 시기별 및 채취방법별 항원 진단 비교평가

○ 본 연구에서는 닭 뉴모바이러스(aMPV)에 대한 항원진단을 평가하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시하였음. 총 30수의 1일령 SPF 병아리에 닭 뉴모바이러스를 마리당 $10^{4.5}$ EID₅₀ 점안으로 공격접종하고 1일, 2일, 3일 및 7일 째 구강 및 비강 스왑을 실시함. 또한, 접종 후 1일, 2일, 3일 및 7일 째 안락사 후 부검하여 비갑개 조직에서의 닭 뉴모바이러스 분리를 실시하였음.

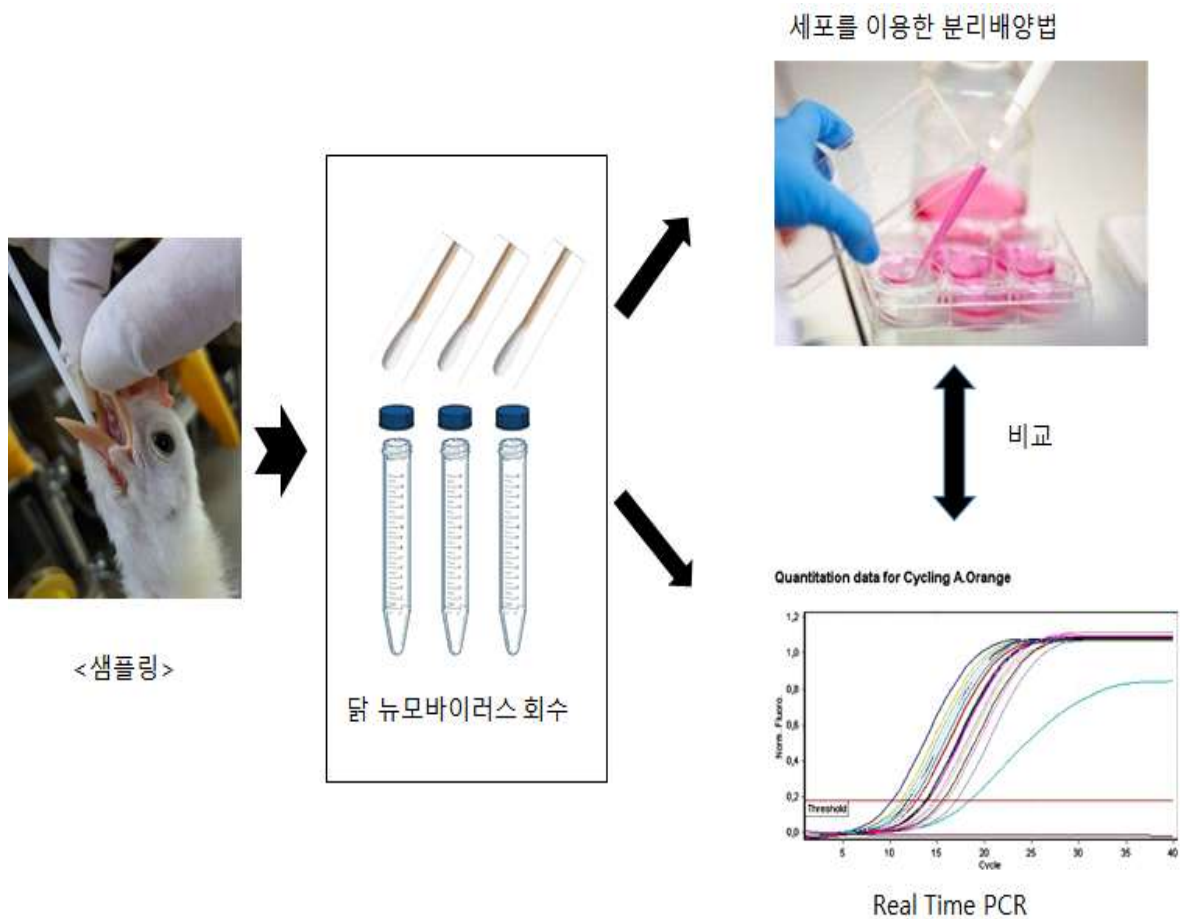
○ 개체별 구강 및 비강 스왑샘플과 비갑개 조직샘플을 이용하여 닭 뉴모바이러스 항원을 진단하기 위하여 스왑샘플 및 조직샘플의 상층액을 채취하여 바이러스를 가장 민감하게 검출할 수 있는 유전자 기반 진단 방법인 real time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하였음. aMPV G gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Ji-Sun Kwon et al., Journal of Veterinary Science, 2010)에 따라 준비하였으며, QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 SmartCycler (Cepheid, USA)에서 aMPV rRT-PCR을 실시하였음.

○ 개체별 구강 및 비강 스왑샘플과 비갑개 조직샘플의 상층액을 세포를 이용하여 닭 뉴모바이러스를 분리배양하기 위하여 먼저, monolayer 형성된 vero세포의 세포배양배지를 제거한 후 멸균 PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용하여 washing 하여 일자별로 채취한 샘플을 vero 세포에 감염시킴. vero 세포에 감염시킨 후 37°C 조건에서의 40분 세포에 흡착 후 세포배양배지를 첨가하여 인큐베이터에 4일간 배양하여 바이러스에 의해 생성되는 CPE (Cytopathogenic effect)를 전체적으로 관찰 후 CPE 유무를 확인하였음.

○ 개체별 구강 및 비강 스왑샘플과 비갑개 조직샘플의 상층액을 세포를 이용하여 닭 뉴모바이러스를 분리배양하기 위하여 먼저, monolayer 형성된 vero세포의 세포배양배지를 제거한 후 멸균 PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용하여 washing 하여 일자별로 채취한 샘플을 vero 세포에 감염시켰음. vero 세포에 감염시킨 후 37°C 조건에서의 40분 세포에 흡착 후 세포배양배지를 첨가 하여 인큐베이터에 4일간 배양 후 감염세포의 상층액을 채취하여 Magna pure 96 (Rosche) 장비를 이용하여 viral RNA를 추출하였으며 QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 SmartCycler (Cepheid, USA)에서 aMPV rRT-PCR을 실시하였음.

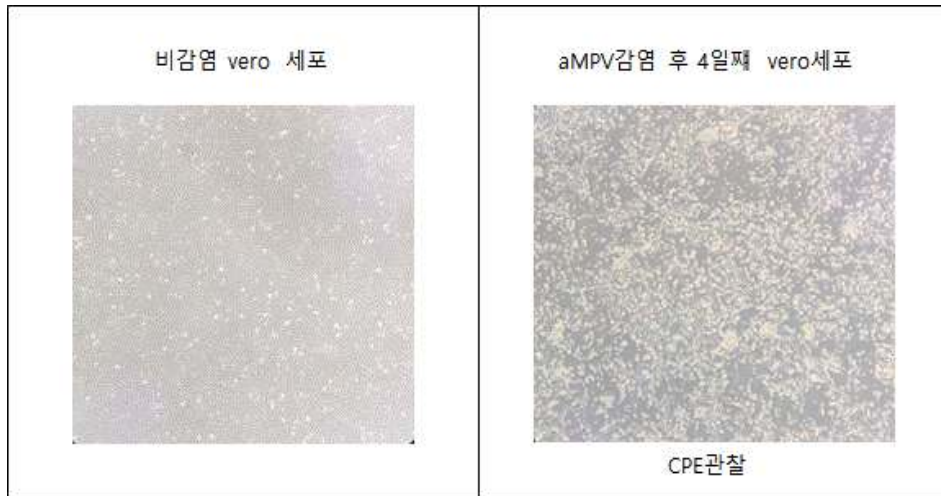


<그림 50> 닭 뉴모바이러스(aMPV) 항원진단비교 평가모델

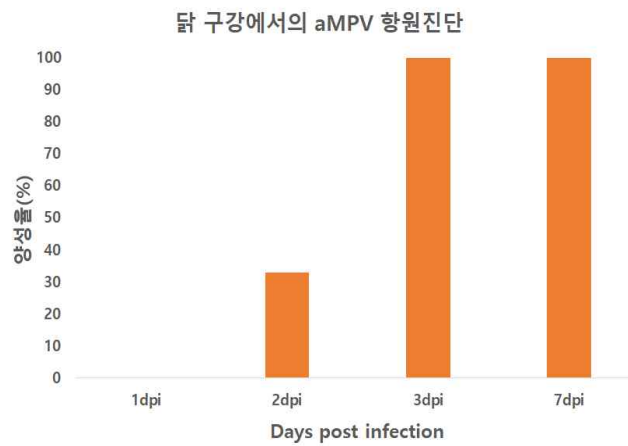


<그림 51> 닭 뉴모바이러스 항원진단 평가 과정

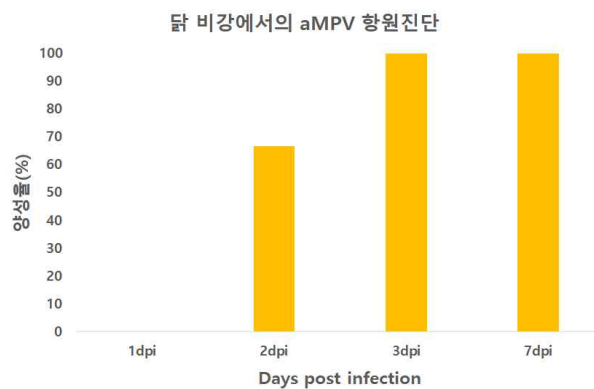
○ 닭 뉴모바이러스(aMPV)는 세포배양으로 항원 진단 시 접종 2일째부터 구강, 비강 스왑샘플에서, 접종 3일째부터는 구강, 비강 및 비갑개 조직 샘플에서 확인되며, 세포배양 시 접종 후 2일째부터 감염확인(CPE)을 할 수 있었으며 접종 4일째에는 세포의 80~90%에서 CPE 형성을 확인 할 수 있었음.



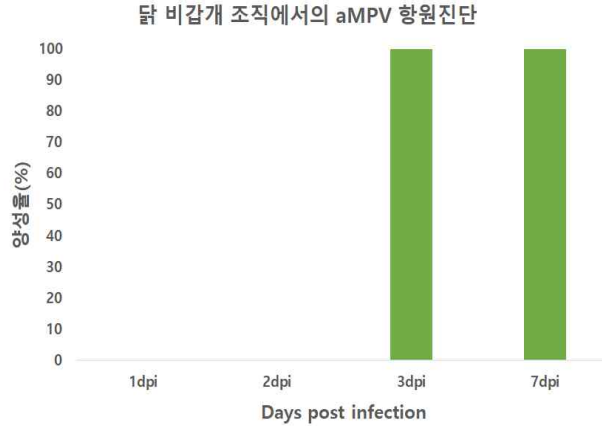
<그림 52> 닭 뉴모바이러스 vero 세포를 이용한 분리배양



<그림 53> 세포를 이용하여 닭 구강에서의 분리배양 후 채취시기별 닭 뉴모바이러스(aMPV)항원진단 그래프



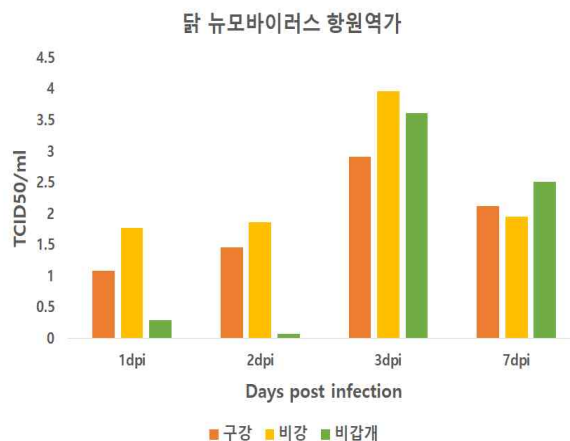
<그림 54> 세포를 이용하여 닭 비강에서의 분리배양 후 채취시기별 닭 뉴모바이러스(aMPV)항원진단



<그림 55> 세포를 이용하여 닭 비갑개 조직에서의 분리배양 후 채취시기별 닭 뉴모바이러스(aMPV)항원진단

○ 닭 뉴모바이러스를 1일령 SPF 병아리에 접종 후 1일, 2일, 3일 및 7일 짜 구강 및 비강 스왑샘플, 비갑개조직 샘플의 상층액을 채취하여 RNA 추출 후 aMPV real time PCR을 실시하고 결과값 cycle threshold(ct)를 이용하여 Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID₅₀) 값으로 환산하여 바이러스 역가($y = -0.267x + 10.789$)를 확인함.

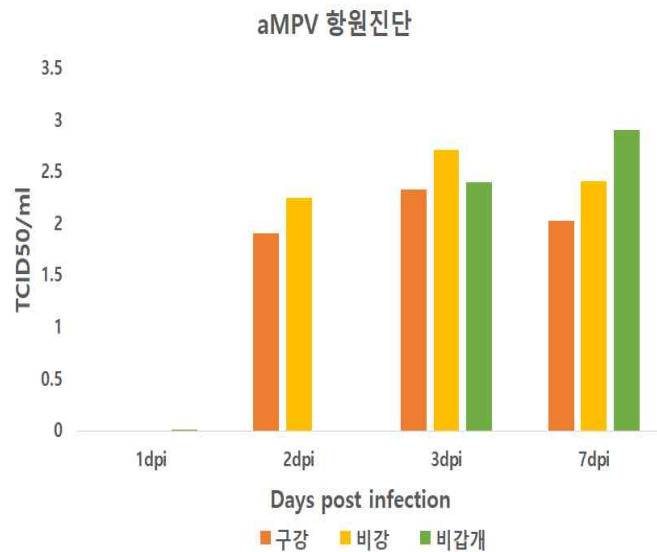
○ 닭 뉴모바이러스 접종 1일째부터 구강 및 비강 스왑샘플에서 바이러스를 확인함. 또한, 접종 3일째에서는 구강, 비강 및 비갑개 조직 샘플에서 100% 닭 뉴모바이러스를 확인하였음. 채취 일자 및 방법별 샘플각각 바이러스 역가를 확인 한 결과 접종 3일째 채취 샘플에서 가장 높은 바이러스 역가를 확인 할 수 있었음. 특히, 비강 스왑샘플에서 평균 0.409 ± 0.42 TCID₅₀/ml 높은 역가를 확인 할 수 있었음.



<그림 56> 뉴모바이러스(aMPV) real time PCR을 이용한 채취시기 및 방법별 항원역가

○ 세포를 이용한 닭 뉴모바이러스를 항원진단 하기 위해 닭 뉴모바이러스를 1일령 SPF 병아리에 접종 후 1일, 2일, 3일 및 7일 째 구강 및 비강 스왑샘플, 비갑개조직을 vero 세포를 이용하여 닭 뉴모바이러스를 4일간 분리배양 함. 배양 후 개체별 감염세포의 상층액을 채취하여 RNA추출후 aMPV real time PCR을 실시한 결과 ct값을 이용하여 TCID50 값으로 환산하여 바이러스 역가($y=-0.267x +10.789$)를 확인하였음.

○ 접종 2일째부터 구강 및 비강 스왑샘플에서 각각 평균역가 $10^{1.78 \pm 0.85} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 및 $10^{2.16 \pm 0.34} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 바이러스를 확인 할 수 있었음. 또한, 접종 3일째 및 7일째에서는 구강, 비강 및 비갑개 조직 샘플에서 100% 닭 뉴모바이러스를 확인 할 수 있었으며 채취 방법별 유사한 바이러스 역가를 확인 할 수 있었음. 특히, 비강 및 비갑개 조직에서 각각 평균역가 $10^{2.68 \pm 1.06} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 및 $10^{2.34 \pm 0.29} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 으로 비교적 높은 바이러스 역가를 확인할 수 있었음.



<그림 57> 세포를 이용한 닭 뉴모바이러스 분리배양 후 real time PCR을 이용한 항원역가

나. 닭 전염성기관지염(IBV) 시기별 및 채취방법별 항원 진단 비교평가

(1) DIA 시험법 및 IBV real time PCR을 이용한 닭 전염성기관지염바이러스 (IBV) 평가 모델

○ 항원진단시 닭 전염성기관지염 바이러스에 의한 계태아 병변이 정확히 명시되어있지 않고, 병변을 관찰하는 측정자에 따라 주관적인 판단이 개입 될 수 있음을 감안하여 본 연구에서 바이러스 항원진단시 발생 할 수 있는 주관적 판정기준을 객관화하기 위하여 면역학적 진단 방법인 Dot-immunoblotting assay(DIA)를 진행하였음. DIA는 닭 전염성 기관지염 바이러스에 특이적인 단일클론 항체를 생산하여 발육계란에 접종한 중화 항체가 증식 할 경우 장요막강에 있는 바이러스를 검출 할 수 있으며 실험자의 주관적 판단에 의존하지 않아도 되는 장점이 있음. 바이러스가 검출되면 발색이 된 원형이 나타나고, 그렇지 않을 경우에는 발색이 되지 않으므로, 별도의 해석 기기가 필요하지 않고 비숙련자에게도 쉬우며 육안으로 실시하는 병변의 판단보다 바이러스의 증식 여부를 판단함으로써 항원진단 및 바이러스 함량 시험에 더 적합할 것으로 판단되었음.

AVIAN DISEASES 42:92-100, 1998

Detection and Classification of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Korea by Dot-Immunoblotting Assay Using Monoclonal Antibodies

Chang-Seon Song,¹ Jae-Hong Kim,² Youn-Jeong Lee,³ Sun-joong Kim,³ Yoshihiro Izumiya,⁴ Yukinobu Tohya,⁵ Hyung-Kwan Jang,⁶ and Takeshi Mikami^{1,6*}

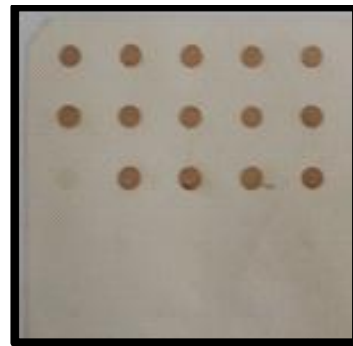
¹Avian Disease Division, National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea

²Department of Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-100, Korea

³Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

⁴Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Received 14 May 1997



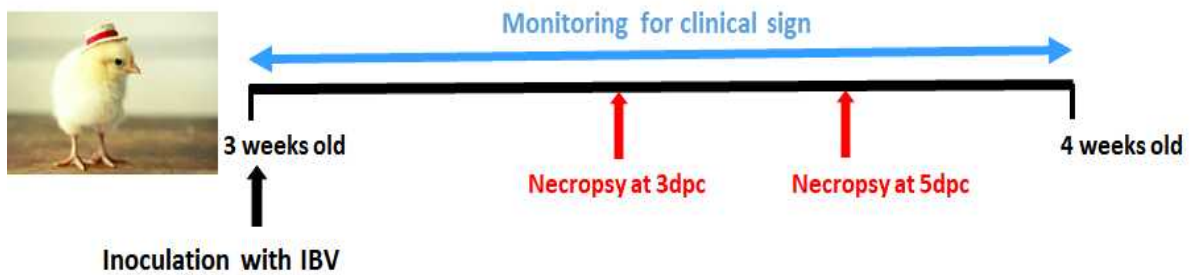
<그림 58> Dot-immunoblotting assay(DIA)을 이용한 바이러스 검출 방법 논문과 실험결과

<표 11> DIA 실험법 SOP에 이용된 실험 품목

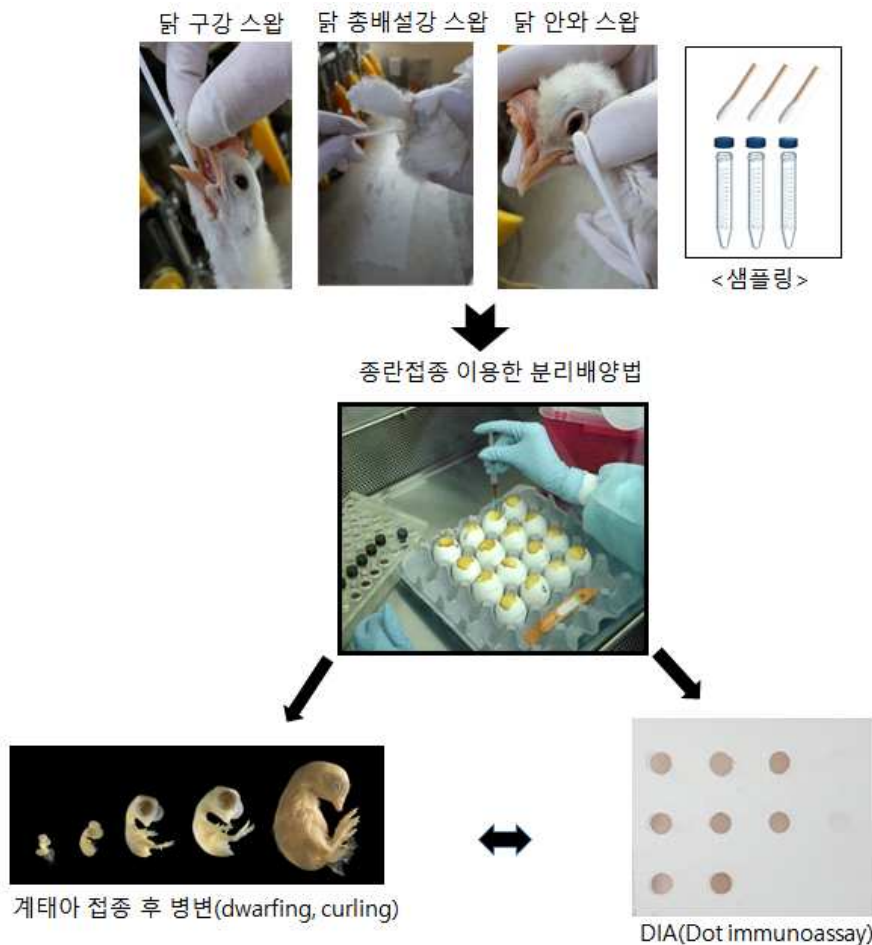
재료 목록	Company
Hybrid-Dot manifold	Bio-Rad
Nitrocellulose membrane	General Electric
Filter paper	General Electric
Peroxidase kits	Vectastatin Elite ABC
3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride	Sigma-aldrich
30% H2O2	Samchun chemical
Sodium chloride	Samchun chemical
1N HCl	Samchun chemical
Ablumin bovine serum	Sigma-aldrich
Tris(base)	Sigma-aldrich
Tris-buffered saline(TBS)	Sigma-aldrich
1% Tween20 + Tris-buffered saline	Sigma-aldrich
Monoclonal antibody (1st Ab)	3F5 monoclonal antibody
Biotinylated anti-mouse igG antibody (2nd Ab)	abcam

○ 닭 전염성기관지염(IBV)에 대한 항원진단을 평가하기 위하여 다음과 같이 시험을 실시 하였음. 총 30수의 3주령 SPF 병아리에 닭 전염성기관지염 바이러스를 마리당 10^{4.5}EID₅₀ 점안으로 공격접종하고 3일 및 7일 제 구강, 안와 및 총배설강 스왑을 실시하였음. 개체별 구강, 안와 및 총배설강 스왑샘플의 상층액을 9~11일령 specific pathogen free(SPF) 발육계란의 장요막강내에 0.1ml의 바이러스를 접종 한 후 37°C 에서 배양하고, 배양 7일 후

생존한 발육계란의 닭 전염성 기관지염 특유의 계태아의 위축 소견(dwarfing, curling)을 확인하였음. 또한, 동일한 샘플의 상층액을 9~11일령 specific pathogen free(SPF) 발육계란의 allantoic fluid에 접종 한 후 3일 배양 후 chilling 하였음. 각 SPF 계란의 allantoic fluid를 수거한 후 3000g, 10min 조건으로 원심분리하여 계란 유기물질을 침전시킨 후 상층액을 이용하여 DIA 시험법으로 바이러스 항원을 확인하였음.

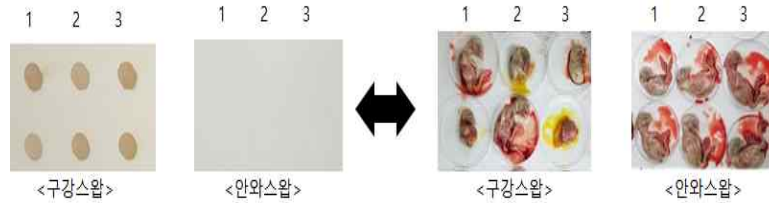


<그림 59> 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 항원진단비교 평가모델



<그림 60> 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 항원진단비교 평가과정

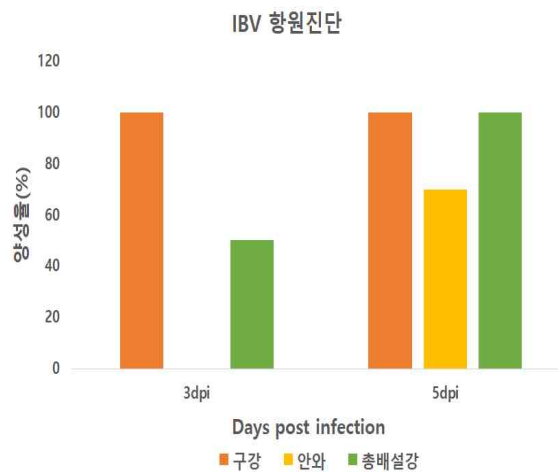
○ 닭 전염성기관지염 바이러스는 계태아 병변판단 기준이 정해져 있지 않아 육안적으로 판단할 수밖에 없었으며, 항원진단시 닭 전염성기관지염 바이러스에 의한 계태아 병변이 정확히 명시되어있지 않고, 병변을 관찰하는 측정자에 따라 주관적인 결과관정으로 확인 할 수 있었음. DIA 방법은 기존의 계태아병변 판단 방법보다 역가 측정 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라 계란에서 증식한 바이러스를 더 민감하게 측정 할 수 있는 것으로 확인 할 수 있었음. (그림 61)



<그림 61> 계태아 병변 및 DIA 시험법을 이용한 IBV 진단비교

(2) 닭 전염성기관지염 바이러스 채취 시기 및 방법별 항원 진단 비교평가

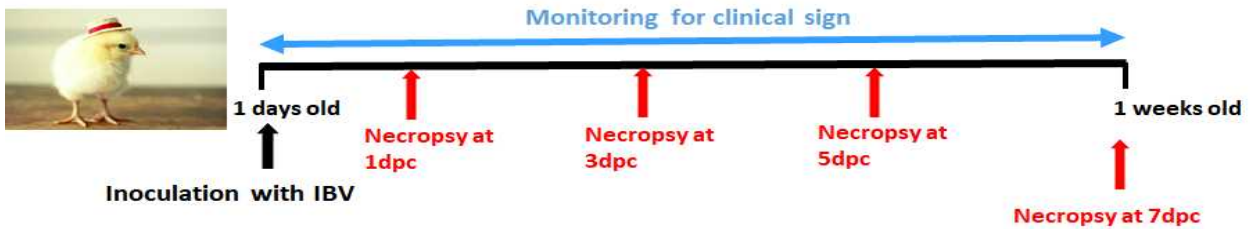
○ 닭 전염성기관지염 바이러스를 3주령 SPF 병아리에 접종 후 3일 및 5일 째 구강, 안와 및 총배설강 스왑샘플의 상층액을 채취하여 9~11일령 specific pathogen free(SPF) 발육계란의 allantoic fluid에 접종 한 후 3일 배양 하여 allantoic fluid를 수거 한 후 상층액을 이용하여 DIA 시험법으로 바이러스 항원을 확인한 결과, 닭 전염성기관지염 바이러스 접종 3일째에서는 구강 및 총배설강 스왑샘플에서 바이러스를 확인 할 수 있었음. 또한, 접종 5일째에서는 구강, 안와 및 총배설강 샘플에서 바이러스를 확인 할 수 있었음. 특히, 구강 및 총배설강 스왑샘플에서는 100% 닭 전염성기관지염 바이러스를 확인 할 수 있었음.



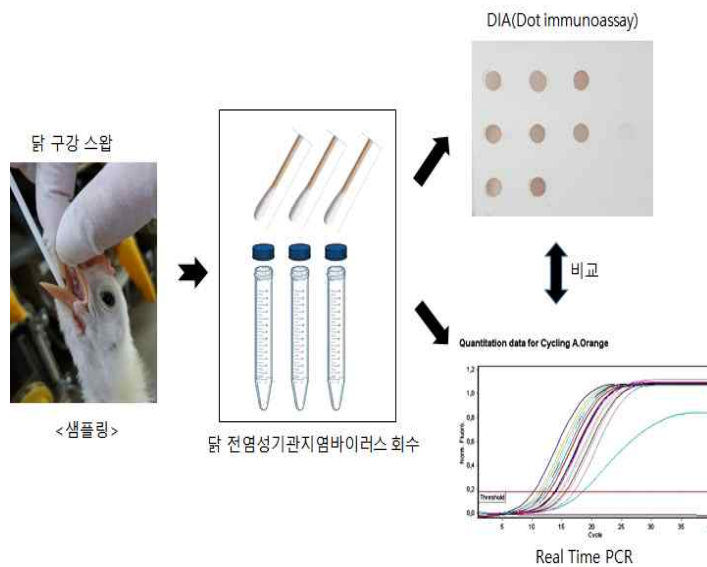
<그림 62> DIA 시험법을 이용한 닭 전염성기관지염 바이러스 채취 시기 및 방법 별 항원 진단 그래프

○ 닭 전염성기관지염 바이러스를 1일령 SPF 병아리에 접종 후 1일, 3일, 5일 및 7일 째 구강 스왑샘플의 상층액을 채취하여 9~11일령 specific pathogen free(SPF) 발육계란의 allantoic fluid에 접종 한 후 3일 배양 하여 allantoic fluid를 수거 한 후 상층액을 이용하여 DIA 시험법으로 바이러스 항원을 확인하고 동일한 스왑샘플의 상층액을 채취하여 바이러스를 가장 민감하게 검출 할 수 있는 유전자 기반 진단 방법인 real time RT-PCR으로 검사하였음.

○ 각 샘플에서 viral RNA를 추출하기 위해 Magna pure 96 (Rosche) 장비를 사용하였음. IBV S1 gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Mark W. Jackwood et al, Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens, Journal of Virological Methods, 2006)에 따라 준비하였으며, QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 ABI 7500 (lifetechnology)에서 IBV rRT-PCR을 실시하였음.

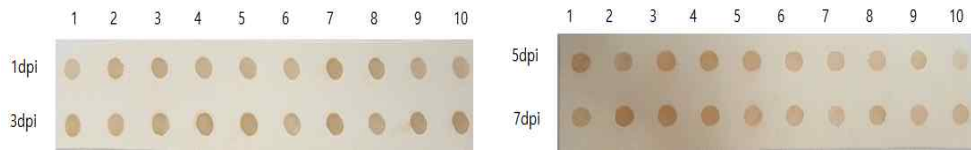


<그림 63> DIA 시험법 및 IBV real time PCR을 이용한 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 항원진단 모델

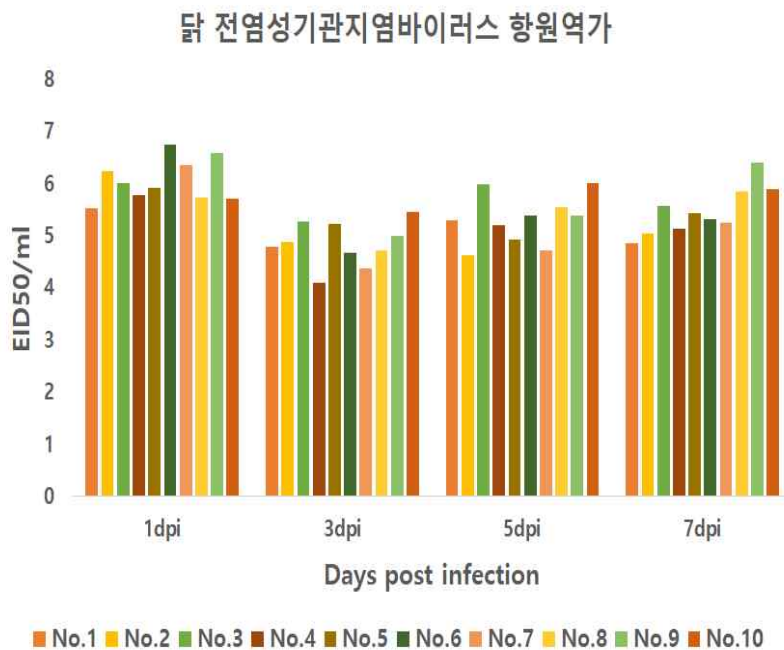


<그림 64> DIA 시험법 및 IBV real time PCR을 이용한 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 평가과정

○ DIA 시험법으로 바이러스 항원을 확인한 결과, 닭 전염성기관지염 바이러스 접종 1일째부터 구강스왑샘플에서 바이러스를 확인 할 수 있었음. 또한, 각 구강스왑 샘플 상층액을 채취하여 IBV real time PCR을 실시한 결과, 결과값 cycle threshold(ct)를 이용하여 Egg Infection Dose 50 (EID50) 값으로 환산하여 바이러스 역가($y=-0.3051x + 12.028$)를 확인 하였음. 그 결과, 닭 전염성기관지염 바이러스 접종 1일째부터 구강 스왑샘플에서 바이러스를 확인 할 수 있었음. 또한, DIA 양성 유무와 rRT-PCR 측정과 100% 동일하게 결과를 확인 할 수 있었음.



<그림 65> DIA 시험법을 이용한 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 항원진단



<그림 66> IBV real time PCR을 이용한 닭 전염성기관지염바이러스(IBV) 항원진단 그래프

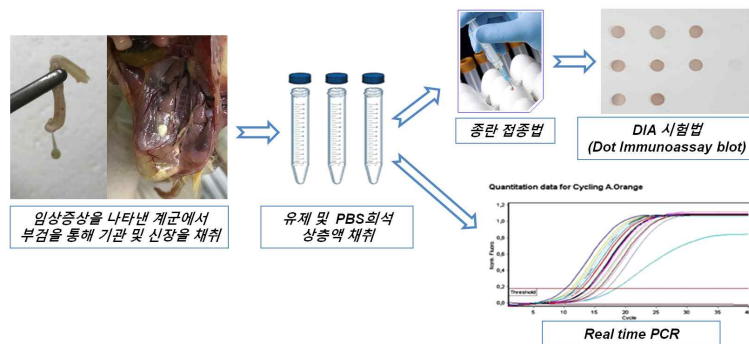
○ 1차년도에 설정된 바이러스 분리배양법 SOP를 바탕으로 건국대학교로 의뢰된 150건의 병성감정 및 충청북도에 위치한 육계 농가 세 곳에서 시기별로 채취된 시료에 대해 aMPV 및 IBV 검출을 진행, 국내 육계농장에 호흡기 증상을 일으켰던 계군에 대한 병성감정을 통해 피해현황 분석을 실시하였음.

다. 육계농장 IBV 피해현황 분석

○ 닭 전염성기관지염 바이러스의 분리를 위하여 기관, 신장 및 맹장편도를 무균적으로 채취. 장기로부터의 바이러스 분리 검사는 종란 내 접종법을 실시. 가검물을 유제하여 멸균 PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용하여 희석한 후, 그 상층액을 채취해 9~11일령 SPF 종란에 접종하고, 37°C 에서 72시간 배양 후 종란의 allantoic fluid를 채취. IBV의 존재 여부는 DIA 시험법을 이용해 판단하였음(Chang-seon Song et al., Avian diseases, 1998).

○ 또한, 1차년도 실험의 결과를 바탕으로 rRT-PCR을 이용한 진단법과 병행하여 바이러스의 존재 유무를 판단하였음. 먼저 채취한 샘플 유제액을 3000g, 10min 조건으로 원심분리하여 유기물질을 침전시킨 후 상층액을 채취해 각 샘플에서 viral RNA를 추출하였음.

IBV S1 gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Mark W. Jackwood et al, Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens, Journal of Virological Methods, 2006)에 따라 준비하였으며, QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 ABI 7500 (lifetechnology)에서 IBV rRT-PCR을 실시 후 DIA와의 양성률을 비교함.



<그림 67> IBV 진단을 위한 DIA(Dot immunoassay) 및 rRT-PCR법의 비교

○ 그 결과, 150건의 시료 중 16건의 닭 전염성기관지염 양성률이 검출됨. 또한 1차년도의 결과와 동일하게, 닭 전염성기관지염 바이러스에 대한 DIA 시험법과 rRT-PCR 측정법에서 100% 동일한 양성률을 확인 하여 rRT-PCR 진단의 높은 민감도를 확인. 이를 통해, 시간 및 노력이 소요되는 종란 접종 후 DIA로 이어지는 샘플 처리법과 비교하여 rRT-PCR 진단법의 신속성 및 간편함을 확인할 수 있었음.

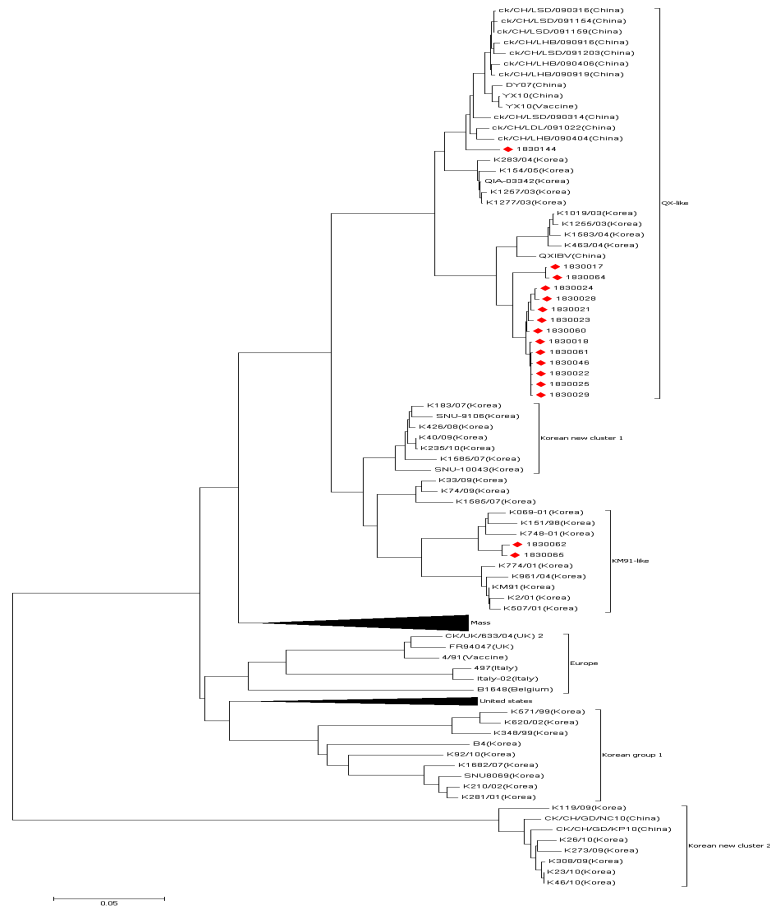
〈표 12〉 양성으로 확인된 16건의 IBV 샘플 시료

샘플 번호	지역	일령	Lesions ^A	Tissues ^B
1830017	경북	35days	RS	Tra, Kid, C.T
1830018	충북	20days	RS,	C.T
1830021	경북	19days	RS, NS	Tra, Kid, C.T
1830022	충북	22days	RS,	C.T
1830023	충북	20days	RS, NS	Tra, Kid, C.T
1830024	충북	18days	NS	Tra, Kid
1830025	충북	28days	RS, NS	Kid
1830028	충북	24days	RS, NS	Tra, Kid, C.T
1830029	충북	24days	RS, NS	Kid
1830046	경북	15days	RS	Tra, C.T
1830060	경기도	21days	RS, NS	Kid
1830061	경북	18days	RS	Tra, C.T
1830062	경기도	20days	RS, NS	Tra, Kid, C.T
1830064	경북	18days	RS, NS	Tra, Kid, C.T
1830065	경북	18days	RS	Tra, C.T
1830144	경북	28days	RS, NS	Tra, Kid, C.T

○ 양성으로 확인된 닭 전염성기관지염에 대해서 계통학적 분석을 위한 염기서열 분석을 실시. 유전자염기서열 분석은 hyper-variableregion(HVR)이 존재하여 IBV의 항원성의 가장 많은 변이를 일으키는 S1 region을 타겟으로 하는 primer set(S1-forward:5' - TAG TGA CCC TTT TGT GTG CAC TAT-3' /S2-reverse:5' -GTT TGT ATG TAC TCA TCT GTA AC-3')를 사용하였음. 먼저, 각각의 양성 샘플에 대해 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 키트(Invitrogen)와 S2-reverse primer를 사용하여 역전사 반응(Reverse transcription)를 실시. 역전사 반응 산물을 이용하여 EX-Taq polymerase (Takara)와 forward, reverse primer를 사용해 PCR을 진행하였음(40cycle; Denaturation 94 °C, 10 초, Annealing 53 °C, 90 초, Polymerization 72 °C, 90 초). PCR 증폭산물은 1%(w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 실시한 다음, Gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 RT-PCR 증폭산물을 추출하여 마크로젠사(Macrogen, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였음.

핵산 염기서열 교정(editing),아미노산 서열예측 및 alignments는 Genious software 9.0 ver을 이용하였음. 유전적 계통수 분석(Phylogenetic tree analysis)는 MEGA version 4.0 ver의 neighbor-joining법(1000 bootstrap replication)을 이용.(Tamura et al.,2007)

○ 유전자 염기서열을 이용한 계통수 분석 결과, 16건의 닭 전염성기관지염 양성 시료 모두 한국형 신장형 타입의 IBV(Korean group 2)로 확인됨. 또한, 이들 중 14건은 2000년도 중반 이후 등장한 중국 유래 QX-like subgroup cluster로 확인되었으며, 2건은 KM91-like subgroup cluster에 속하는 것을 확인함. 또한, 과거 유행하던 한국형 호흡기형 IBV Korean group1은 단 한건도 발생하지 않음을 확인. 이를 통해 현재 한국의 육계농장에서 주요한 피해를 입고 있는 닭 전염성기관지염은 주로 QX 타입인 것으로 확인되었으며, 과거에 비해 그 발생이 점차 증가하고 있는 것을 확인함.



〈그림 68〉 IBV 양성에 대한 S1 유전자 기반 Phylogenetic Tree 분석 결과

○ 또한, 모든 샘플에서 18일령 이후에 호흡기 및 신장염 등의 임상증상을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해 육계 농장의 모니터링을 실시할 시 최적의 바이러스 채취 시기는 2~3주령이라는 것을 확인할 수 있었음.

○ 육계 농장의 경우 주로 1일령에 닭 전염성기관지염 백신 접종을 실시하고 있는데, 국내에서는 Mass type 및 한국형 신장형주 약독화 백신(K2)이 상용화되어 사용되고 있음. QX type의 경우 현재까지 시판되고 있는 백신은 존재하지 않기 때문에, 병성감정에서 분리된 QX-like IBV는 모두 야외 감염이 일어난 것으로 판단. 따라서 농가의 꾸준한 백신사용 및 부분적 교차방어능을 갖는 IBV의 특성에도 불구하고, 기존의 백신주로는 QX type IBV를 효과적으로 방어하기 힘들다는 것을 확인하였으며, 새로운 QX type의 백신 개발이 필요한 것으로 사료됨.

라. 육계농장 aMPV 피해현황 분석

○ 농장에서 호흡기증상을 보였던 150건의 샘플에 대해 닭 뉴모바이러스(aMPV)에 대한 바이러스 검출 또한 실시함. 개체별로 구강 및 비갑개 시료를 채취하여, 1차년도에 기술한 바와 같이 세포 및 rRT-PCR을 이용해 진단을 실시. 먼저, 유체액의 상층액을 분리하여 vero 세포에 감염시킨 후 37°C 조건에서의 40분 세포에 흡착 후 세포배양배지를 첨가하여 인큐베이터에 4일간 배양하여 바이러스에 의해 생성되는 CPE (Cytopathogenic effect)를 전체적으로 관찰 후 CPE 유무를 확인.

또한 상층액의 유전자를 추출하여 rRT-PCR을 진행하였으며, aMPV G gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Ji-Sun Kwon et al., Journal of Veterinary Science, 2010)에 따라 준비하여 QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 SmartCycler (Cepheid, USA)에서 aMPV rRT-PCR을 실시.

○ 150건의 병성감정 및 육계농장 시기별 채취 시료에 대해, 세포와 rRT-PCR 진단법 모두에서 닭 뉴모바이러스 음성으로 확인됨. 따라서 aMPV는 현재 국내 육계농가에서, IBV에 비해 상대적으로 적은 피해를 주는 호흡기 질병인 것으로 판단됨.

마. 산란계/중계 농장 IBV, aMPV 피해현황 분석

○ 1차년도에 설정된 바이러스 분리배양법 SOP를 바탕으로 건국대학교로 의뢰된 167건의 병성 감정 및 충청북도에 위치한 산란계/중계 농가 세 곳에서 시기별로 채취된 시료에 대해 aMPV 및 IBV 검출을 진행, 국내 산란계/중계 농장에 호흡기 증상 및 산란율 저하를 일으켰던 계군에 대한 병성감정을 통해 피해현황 분석을 실시하였음.

(1) 산란계/중계 농장 IBV 피해현황 분석

○ 닭 전염성기관지염 바이러스의 분리를 위하여 기관, 신장 및 맹장편도를 무균적으로 채취. 장기로부터의 바이러스 분리 검사는 종란 내 접종법을 실시. 가검물을 유제하여 멸균 PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용하여 희석한 후, 그 상층액을 채취해 9~11일령 SPF 종란에 접종하고, 37°C에서 72시간 배양 후 종란의 allantoic fluid를 채취. IBV의 존재 여부는 DIA 시험법을 이용해 판단하였음.(Chang-seon Song et al., Avian diseases, 1998).

○ 또한, 1차년도 실험의 결과를 바탕으로 rRT-PCR을 이용한 진단법과 병행하여 바이러스의 존재 유무를 판단하였음. 먼저 채취한 샘플 유제액을 3000g, 10min 조건으로 원심분리하여 유기물질을 침전시킨 후 상층액을 채취해 Viral Gene-spin Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotech, Korea)을 사용하여 각 샘플에서 viral RNA를 추출하였음. IBV S1 gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Mark W. Jackwood et al, Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens, Journal of Virological Methods, 2006)에 따라 준비하였으며, QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 ABI 7500 (lifetechnology)에서 IBV rRT-PCR을 실시 후 DIA와의 양성률을 비교함.

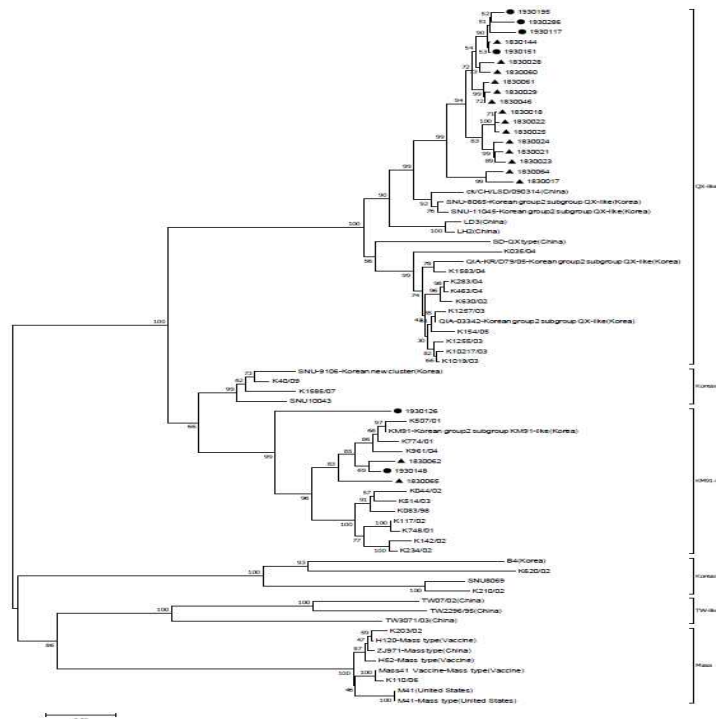
○ 실험 결과, 167건의 시료 중 6건의 닭 전염성기관지염 양성이 검출됨. 또한 1차년도의 결과와 동일하게, 닭 전염성기관지염 바이러스에 대한 DIA 시험법과 rRT-PCR 측정법에서 100% 동일한 양성률을 확인 하여 rRT-PCR 진단의 높은 민감도를 확인. 이를 통해, 시간 및 노력이 소요되는 종란 접종 후 DIA로 이어지는 샘플 처리법과 비교하여 rRT-PCR 진단법의 신속성 및 간편함을 확인할 수 있었음.

<표 13> 양성으로 확인된 6건의 IBV 샘플 시료

샘플번호	일령	Lesions	Tissues
1930117	31days	RS, NS	Tra, Kid, CT
1930126	34days	RS, NS	Tra, Kid, CT
1930148	14days	RS,	Tra
1930151	33days	RS, NS	Kid, CT
1930195	19days	RS, NS	Tra, Kid, CT
1930286	30days	RS, NS	Tra, Kid, CT

○ 양성으로 확인된 닭 전염성기관지염에 대해서 계통학적 분석을 위한 염기서열 분석을 실시. 유전자염기서열 분석은 hyper-variable-region(HVR)이 존재하여 IBV의 항원성의 가장 많은 변이를 일으키는 S1 region을 타겟으로 하는 primer set(S1-forward:5' - TAG TGA CCC TTT TGT GTG CAC TAT-3' /S2-reverse:5' -GTT TGT ATG TAC TCA TCT GTA AC-3')를 사용하였음. 먼저, 각각의 양성 샘플에 대해 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase 키트(Invitrogen)와 S2-reverse primer를 사용하여 역전사 반응(Reverse transcription)를 실시. 역전사 반응 산물을 이용하여 EX-Taq polymerase (Takara)와 forward, reverse primer를 사용해 PCR을 진행하였음(40cycle; Denaturation 94 °C, 10 초, Annealing 53 °C, 90 초, Polymerization 72 °C, 90 초). PCR 증폭산물은 1%(w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 실시한 다음, Gel extraction kit(Qiagen)를 이용하여 RT-PCR 증폭산물을 추출하여 마크로젠사(Macrogen, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였음. 핵산 염기서열 교정(editing),아미노산 서열예측 및 alignments 는 Genious software 9.0 ver을 이용하였음. 유전적 계통수 분석(Phylogenetic tree analysis)는 MEGA version 4.0 ver의 neighbor-joining법(1000 bootstrap replication)을 이용함.(Tamura et al.,2007)

○ 유전자 염기서열을 이용한 계통수 분석 결과, 6건의 닭 전염성기관지염 양성 시료 중 모두 한국형 신장형 타입의 IBV(Korean group 2)로 확인됨. 이들 중 4건은 2000년도 중반 이후 등장한 중국 유래 QX-like subgroup cluster로 확인되었으며, 2건은 KM91-like subgroup cluster에 속하는 것을 확인함. 반면에, 과거 유행하던 한국형 호흡기형 IBV Korean group1은 단 한건도 발생하지 않음을 확인. 이를 통해 현재 한국의 산란계/종계농장에서 주요한 피해를 입히고 있는 닭 전염성기관지염은 주로 QX 타입인 것으로 확인되었으며, 과거에 비해 그 발생이 점차 증가하고 있는 것을 확인함.



<그림 69> IBV 양성에 대한 S1 유전자 기반 Phylogenetic Tree 분석 결과 (2차, 3차년도)

○ 전년도 육계 같은 경우, 출하일령이 대략 30일이어서 최적의 바이러스 채취 시기는 2~3주령이었지만, 65~70주령까지 산란을 하는 산란계/종계 같은 경우에는 데이터 분석 결과, 최적의 바이러스 채취 시기는 2~5주령이라는 것을 확인할 수 있었음.

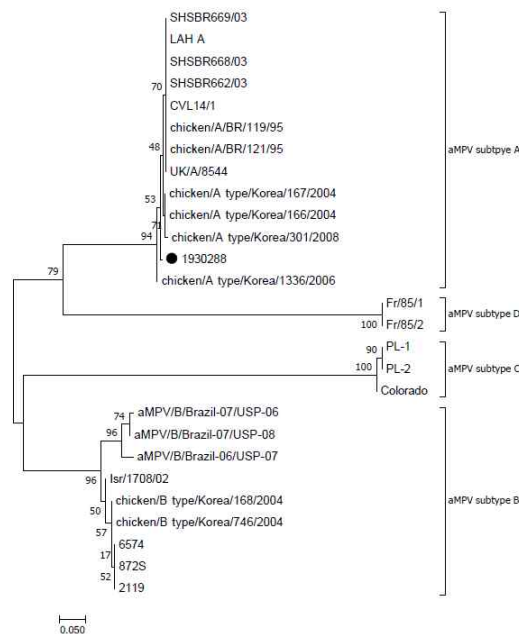
○ 닭 전염성기관지염 바이러스는 모든 일령에 감수성이 존재하지만 낮은 일령의 병아리일수록 병원성이 높아 신장염 및 호흡기 임상증상을 나타내며 2차적인 세균감염까지 동반하면 높은 폐사율을 보임. 하지만 주령이 높을수록 산란을 감소 외에는 뚜렷한 임상증상을 보이지 않아, 농가측에서는 IBV에 감염되어도 모르고 지나치는게 일상임. 이는 3차년도 IBV 양성 샘플이 대부분 낮은 일령에 분리된 점을 설명해줌. 더불어, QX 생독백신이 제품화된 현 상황에서 미루어보았을 때, 야외주 감염으로부터 감별하기 위해서는 QX 항원 기반으로 제작된 ELISA를 농가에 적용하는 것이 추천됨. 이를 통해, QX 야외주 및 백신주 감별은 물론이고 높은 주령에서 IBV 진단에 도움이 될 것으로 사료됨.

(2) 산란계/종계 농장 aMPV 피해현황 분석

○ 농장에서 호흡기증상을 보였던 167건의 샘플에 대해 닭 뉴모바이러스(aMPV)에 대한 바이러스 검출 또한 실시함. 개체별로 구강 및 비갑개 시료를 채취하여, 1차년도에 기술한 바와 같이 세포 및 rRT-PCR을 이용해 진단을 실시. 먼저, 유체액의 상층액을 분리하여 vero 세포에 감염시킨 후 37°C 조건에서의 40분 세포에 흡착 후 세포배양배지를 첨가하여 인큐베이터에 4일간 배양하여 바이러스에 의해 생성되는 CPE (Cytopathogenic effect)를 전체적으로 관찰 후 CPE 유무를 확인. 또한 상층액의 유전자를 추출하여 rRT-PCR을 진행하였으며, aMPV G gene의 검출을 위한 primer와 probe는 참고논문(Ji-Sun Kwon et al., Journal of Veterinary Science, 2010)

에 따라 준비하여 QuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen, USA)를 이용하여 SmartCycler (Cepheid, USA)에서 aMPV qRT-PCR을 실시함.

○ 167건의 병성감정 및 산란계/종계 농장 시기별 채취 시료 검사 결과, 1건의 닭 뉴모바이러스 양성 샘플이 확인됨. 산란을 저하를 보이는 종계 46주령 비갑개에서 바이러스 검출되었으며 위 언급된 aMPV G gene 증폭을 위한 primer를 이용하여 PCR을 진행하였음. 증폭산물을 추출하여 마크로젠사(Macrogen, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였으며 핵산 염기서열 교정(editing),아미노산 서열예측 및 alignments는 Genious software 9.0 ver을 이용하였음. 유전적 계통수 분석(Phylogenetic tree analysis)는 MEGA version 4.0 ver의 neighbor-joining법(1000 bootstrap replication)을 이용함.(Tamura et al.,2007)



<그림 70> aMPV 양성에 대한 G partial 유전자 기반 Phylogenetic Tree 분석 결과

○ 유전자 염기서열을 이용한 계통수 분석 결과, 양성으로 확인된 닭 뉴모바이러스는 A-type으로 확인되었음. 닭 뉴모바이러스 항원 검출은 폐사계 또는 농가에 직접 방문하여 채취된 비강점액 및 비갑개를 연구소로 운반한뒤 병원체를 진단하고 분리하는 방법임. 하지만 이와 같은 방법의 경우, 환경저항성이 낮은 바이러스 특성상, 체외에서 존재하는 기간이 매우 짧으므로 정확한 진단에 어려움이 있음. 닭 뉴모바이러스가 장기간 외부환경에 유지할 수 있는 조건 확인 실험을 통해 효과적인 바이러스 운송법이 필요함.

3. 닭 전염성기관지염(IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시 (2협동연구기관 : 바이오엔텍)

가. 국내 시판중인 ND, IB 생독백신에 대해 SPF 닭에서 주령별 백신 접종 평가를 진행하여 시판 ND ELISA kit의 항체 검출능 비교

○ 현재 국내 시판 ND(Newcastle Disease; ND) ELISA kit의 항체 검출능을 확인하기 위하여 시판중인 ND, IB 합제 생독백신을 표14과 같이 그룹당 각 10마리의 1일령 SPF 병아리를 동시에 분무접종한 뒤 Isolator에 격리사육을 하였음. 그 후 2주령의 두 그룹을 전수 채혈한 후 Group 2만의 음수접종을 진행한 후 5 주령에 다시 한번 채혈을 진행함. 이렇게 얻어진 혈청을 국내 시판 ND ELISA kit를 사용하여 항체가 측정을 실시하였음.

<표 14> 실험군의 구분

구분	종	백신 접종		주령별 채혈 진행 여부	
		1일령 분무	2주령 음수	2주령	5주령
Group 1	SPF	○	-	○	○
Group 2	SPF	○	○	○	○

○ 1일령 SPF 닭에 ND+IB 합제백신 분무만을 진행한 후 2주차 항체 검사 결과 시 10마리 중 5마리만의 양성 판정(50%)을 확인할 수 있었으며, 양성개체와 음성개체간의 편차가 큰 것을 확인할 수 있었음. (표 15)

<표 15> Group 1의 1일령 SPF의 분무 백신 후 2주차 ND 항체가 검사 결과

개체번호	OD value	Corr.OD	S/P ratio	log titer	ELISA titer
1	0.050	-0.059	-0.093	-	1
2	0.181	0.072	0.115	1.866	74
3	0.125	0.016	0.026	0.705	5
4	0.241	0.132	0.209	2.337	217
5	0.702	0.593	0.941	3.513	3255
6	0.411	0.302	0.479	2.984	965
7	0.128	0.019	0.030	0.828	7
8	0.170	0.061	0.096	1.731	54
9	0.604	0.495	0.785	3.370	2346
10	0.505	0.396	0.628	3.196	1572
총합	S/P값		Titer 값	판정	결과
	0.199이하		200이하	음성	5/10
		0.2이상	201이상	양성	5/10

○ 5주차 항체가 검사 결과 70%만이 항체 양성률을 나타냄을 확인할 수 있었음. (표 16)

<표 16> Group1의 1일령 SPF 의 분무 백신 후 5주차 ND 항체가 검사 결과

개체번호	OD value	Corr.OD	S/P ratio	log titer	ELISA titer
1	0.121	0.012	0.019	0.460	3
2	0.040	-0.068	-0.109	-	1
3	0.356	0.247	0.392	2.828	674
4	0.339	0.230	0.364	2.770	589
5	0.548	0.439	0.697	3.277	1894
6	0.710	0.602	0.954	3.523	3336
7	0.318	0.209	0.332	2.698	499
8	0.048	-0.061	-0.097	-	1
9	0.710	0.601	0.954	3.523	3334
10	0.651	0.542	0.860	3.442	2767
총합	S/P값		Titer 값	판정	결과
	0.199이하		200이하	음성	3/10
0.2이상		201이상	양성	7/10	

○ 1일령 SPF 병아리에 합제백신을 분무 한 후 음수 백신 접종 전 2주령 닭의 항체가 검사를 진행한 결과 같이 분무 백신을 접종한 Group 1보다 높은 80%의 항체 양성률을 확인할 수 있었음. (표 17)

<표 17> Group2의 1일령 SPF 분무 백신 후 2주차 ND 항체가 검사 결과

개체번호	OD value	Corr.OD	S/P ratio	log titer	ELISA titer
1	0.073	-0.036	-0.057	-	1
2	0.687	0.578	0.917	3.492	3105
3	0.207	0.098	0.155	2.104	127
4	0.540	0.431	0.683	3.262	1828
5	0.368	0.259	0.411	2.866	734
6	0.434	0.325	0.515	3.042	1100
7	0.294	0.185	0.294	2.602	400
8	0.657	0.548	0.869	3.451	2822
9	1.046	0.937	1.488	3.870	7408
10	0.822	0.713	1.131	3.656	4530
총합	S/P값		Titer 값	판정	결과
	0.199이하		200이하	음성	2/10
0.2이상		201이상	양성	8/10	

○ 5주차 항체 검사 결과 역시 2주차 채혈과 같은 80%의 항체 양성률을 나타내었으며, 이는 Group 1이 항체 양성률에 10%의 차이를 확인할 수 있었음. (표 18)

<표 18> Group2의 1일령 SPF 분무 백신 및 2주령 음수 백신 후 5주차 ND 항체가 검사 결과

개체번호	OD value	Corr.OD	S/P ratio	log titer	ELISA titer
1	0.282	0.173	0.274	2.549	354
2	0.668	0.559	0.887	3.466	2927
3	0.124	0.015	0.024	0.640	4
4	1.224	1.115	1.769	4.006	10135
5	0.714	0.605	0.959	3.527	3368
6	0.284	0.175	0.278	2.560	363
7	0.190	0.082	0.129	1.961	91
8	0.555	0.446	0.708	3.290	1950
9	0.887	0.778	1.234	3.725	5304
10	0.752	0.643	1.019	3.575	3757
총합	S/P값		Titer 값	판정	결과
	0.199이하		200이하	음성	2/10
	0.2이상		201이상	양성	8/10

나. NDV 및 IBV ELISA test, NDV HI test, IBV 중화시험을 통한 항체 양성을 비교시험 진행

○ 표 19 과 같이 시험군을 나누어 대조군을 제외한 1일령 SPF 병아리에 3종류의 ND+IB 생혼합건조백신을 각각 1수분씩 분무접종함. 백신 2주 후(2주령)에 NDV에 대한 혈청역가를 확인하기 위하여 전수를 채혈한 뒤 닭 적혈구응집억제시험(HI test)과 ELISA test를 이용하여 면역원성을 확인하였음. 또한, 백신 3주 후(3주령)에 IBV에 대한 혈청역가를 확인하기 위하여 다시 한번 전수를 채혈한 뒤 중화시험(VN test)과 ELISA test를 병행함.

<표 19> 시험군의 구분

구분	공시 수	백신	백신경로
Group 1	10	ND+IB 생혼합건조백신 시제품 1	분무
Group 2	10	ND+IB 생혼합건조백신 시제품 2	분무
Group 3	10	ND+IB 생혼합건조백신 시제품 3	분무
Group 4	10	-	-

○ 생혼합건조백신 접종 2주 후 채혈을 통한 ND의 HI와 ELISA test를 진행한 결과, HI test에서는 전수 모두 100% 양성이 나오는 것으로 확인된 반면 ELISA titer의 경우 Group 2에서 80%만이 양성을 나타낸 것을 확인할 수 있었음.

<표 20> 1일령 SPF 병아리에서 시험백신 접종 후 시험군의 NDV에 대한 혈청 항체가

구분	NDV HI test		ELISA Titer	
	Hi titer	양성률(%)	ELISA titer	양성률 (%)
Group 1	3.5 ± 1.3	10/10 (100%)	5633 ± 2630	10/10 (100%)
Group 2	5.5 ± 1.7	10/10 (100%)	3611 ± 4447	8/10 (80%)
Group 3	4.1 ± 1.7	10/10 (100%)	5125 ± 3971	10/10 (100%)
Group 4	0	0/0 (0%)	1	0/10 (0%)

○ 생혼합건조백신 접종 3주 후 전수 채혈을 통한 IBV의 중화시험과 ELISA test를 비교한 결과, Group 1에서 Group 3로 갈수록 백신의 국가검정 기준인 중화지수가 높아지는 것에 반해 ELISA titer의 양성률은 Group 2에서 가장 낮은 40%를 기록하는 것을 확인하였음.

<표 21> 1일령 SPF 병아리에서 시험백신 접종 후 시험군의 IBV에 대한 혈청 항체가

구분	중화지수	ELISA Titer	
		ELISA titer	양성률 (%)
Group 1	1.2	831 ± 1025	5/10 (50%)
Group 2	2.4	663 ± 570	4/10 (40%)
Group 3	3.6	1182 ± 889	6/9 (66.7%)
Group 4	-	1	0/10 (0%)

다. IBV ELISA test, IBV VN test를 통한 항체 양성을 비교시험 진행

○ 표 22 과 같이 시험군을 나누고 대조군을 제외한 3주령 SPF 닭에 IB 백신을 각각 1수분씩 분무접종함. 백신 3주 후(3주령)에 IBV에 대한 혈청역가를 확인하기 위하여 전수를 채혈한 뒤 중화시험(VN test)과 ELISA test를 병행하였음.

<표 22> 시험군의 구분

구분	공시 수	백신	백신경로
Group 1	10	IB 생건조백신 시제품 1	분무
Group 2	10	IB 생건조백신 시제품 2	분무
Group 3	10	-	-

○ 백신 접종 3주 후 전수 채혈을 통한 IBV의 중화시험과 ELISA test를 비교한 결과, 중화지수가 국가검정 기준인 2.0을 모든 그룹이 넘었으며 ELISA titer 역시 모두 100%의 양성률을 나타내는 것을 확인함. (표 23)

<표 23> 3주령 SPF 닭에 시험백신 접종 후 시험군의 IBV에 대한 혈청 항체가

구분	중화지수	ELISA Titer	
		ELISA titer	양성률 (%)
Group 1	3.4	2683	10/10 (100%)
Group 2	3.6	3359	10/10 (100%)
Group 3	-	1	0/10 (0%)

라. NDV 시판백신의 genotype, serotype에 따른 항체역가 분석을 진행하여 각 type에 따른 항체 양성 역가 비교

○ 1일령 SPF 병아리 30수를 표 24 과 같이 구분하여 격리 사육하였음. 1일령의 SPF 병아리에 각 시험군별로 Genotype II에 속하는 Lasota, Avinew 백신과 Genotype I에 속하는 K148/08 strain 백신 1수분을 분무접종함. 백신 접종 2주 및 3주 후 NDV에 대한 혈청역가를 확인하기 위한 채혈을 진행한 후, 혈구응집억제시험(HI test)를 이용하여 면역원성을 확인하였음.

<표 24> 시험군의 구분

구분	공시수수	백신접종경로	백신 strain
Group 1	10	분무접종	Genotype I K148/08 strain
Group 2	10	분무접종	Genotype II Avinew
Group 3	10	분무접종	Genotype II LaSota
Group 4	10	-	-

○ ND genotype 별 백신 후 2주차 혈청에 대한 ELISA 이용 항체가 검사 결과, genotype I에 해당하는 백신이 가장 높은 항체를 형성하는 것으로 확인되었으며, Group 2의 양성률 역시 ELISA titer에 맞춰 70%만의 양성률이 나타남. 반면, HI titer는 실험군 3그룹 모두에서 100%의 양성률을 나타냄. 이를 통해, HI titer와 ELISA titer의 결과가 서로 일치하지 않으며, 개선의 여지가 필요할 것으로 여겨짐. (표 25)

<표 25> 각 genotype별 ND 백신 2주차 항체검사 결과

구분	백신 strain	ELISA titer (Mean ± SD)	양성률
Group 1	Genotype I K148/08 strain	5633 ± 2630	10/10
Group 2	Genotype II Avinew	763 ± 1029	7/10
Group 3	Genotype II LaSota	1422 ± 1465	10/10
Group 4	-	1	0/10

○ 시범 농가 3곳을 설정하여 농가 한 계군 이상을 대상으로 1일령 출하전 까지 시기별로 채혈을 진행하여 NDV 및 IBV에 대한 항체가 분석을 진행함.

마. 육계농장 NDV 항체가 추이 분석

○ 시범 농가 3곳을 설정하여 농가 한 계군 이상을 대상으로 1일령 출하전 까지 시기별로 채혈을 진행하여 NDV에 대한 항체가 분석을 진행함.

○ NDV는 혈구응집 억제반응(HI test)으로 항체역가를 검사를 실시하였음. 96 well microplate 전체에 멸균된 Phosphate buffered saline (PBS)을 각각 25 μ l씩 넣은 후, 시범농가에서 채취된 시료의 혈청을 25 μ l씩 A①~H① well에 주입하였으며, 이를 2진 희석하여 4HA unit 항원을 전 well에 넣고 잘 흔들어 준 후 실온에서 30분간 반응시킴. 이후 닭 뉴캐슬병 항체가 없는 닭에서 채혈한 혈액을 동량의 Alseiver's 액을 가하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액과 백혈구를 제거시킨 후, PBS를 사용해 3회 이상 세척한 후 침전된 적혈구 용적을 감안하여 닭 적혈구가 1%가 함유되도록 PBS에 부유시킴. 제작된 1% 적혈구를 25 μ l씩 전 well에 주입한 후 plate를 잘 흔들고, 실온에서 40분간 반응시킨 후 혈구응집억제정도를 관찰. 양성 혈청또한 동일한 방법으로 시행하였으며, 결과의 판독은 HI titer 2이상을 양성으로 함. HI titer는 log₂ 값으로 산출하였음.

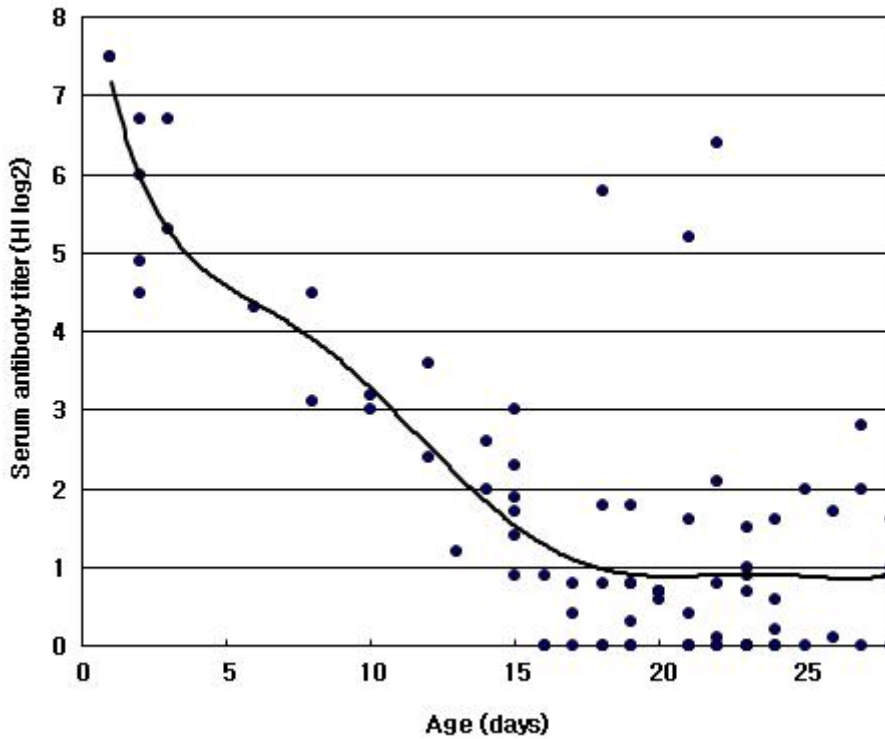
<표 26> 시범 농장 3곳의 1일령 및 출하전 혈청시료에 대한 NDV HI test 결과

	채취 시기	HI titer (Mean \pm SD)	HI 결과
A 농장	1일령	7.1 \pm 1.1	8/10
	28일령	0.0 \pm 0.0	0/10
B 농장	1일령	7.0 \pm 1.2	9/10
	28일령	0.2 \pm 0.6	1/10
C 농장	1일령	7.5 \pm 0.5	10/10
	28일령	0.9 \pm 0.9	5/10

○ 그 결과, 시범 농가 3곳의 1일령 모체이행항체의 HI titer는 모두 7.0이상으로 나타난 것을 확인할 수 있었음. 이후 항체가는 점점 감소하여 육계 출하 시기인 28일령에는 대부분이 소실되어 야외감염 방어수준 이하의 낮은 항체가를 나타냄.

○ 시범농가에서 채취한 혈청에 대한 국내 시판 NDV ELISA kit를 사용한 분석은 현재 진행중인 상태임.

○ 또한, 농장 한 곳을 대상으로 시기별로 10개의 혈청 시료를 채취하여, 육계의 NDV에 대한 더욱 세부적인 항체가의 추이를 관찰함. 혈청 시료는 28일령 출하시기 전까지 매일 채취하여 NDV에 대한 항체가를 검사. 그 결과, 1일령은 평균 HI titer 7 이상으로 나타남. 이후 항체가는 계속적으로 감소하였으나, 2주령까지는 평균 2.3으로 야외 감염 방어 가능 수준의 항체가를 유지하는 것을 확인할 수 있었음. 15일령 이후, 대부분이 소실되어 출하일령까지는 야외 감염 방어 수준 이하의 낮은 항체가를 유지하였음.



<그림 71> 시험농가 C의 시기별 혈청시료 채취를 통한 육계의 NDV 항체가 추이 분석

바. 육계농장 IBV 항체가 추이 분석

○ 시범 농가 3곳을 설정하여 농가 한 계군 이상을 대상으로 1일령 출하전 까지 시기별로 채혈을 진행하여 IBV에 대한 항체가 분석을 진행함.

○ IBV는 메디안디노스틱사의 IBV ELISA kit를 사용하여 kit의 방법에 준하여 항체가를 분석함. 먼저 희석용액 96 well plate의 각 well에 시험 농장에서 채취된 시기별 혈청을 6 μ l를 넣어 희석용액을 이용하여 희석하고, 표준 음성 및 양성혈청 또한 동일하게 희석. 이후, IBV 항원이 코팅된 메디안디노스틱사의 IBV ELISA plate의 각 well에 희석용액을 분주한 후, 상온에서 30분간 반응시킴. 그 후, 반응액을 제거한 후 멸균된 Phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척(washing)함. 이후, peroxidase conjugated anti-chicken IgG를 각 well에 첨가하여 반응시킴. 다시 세척용액을 이용해 3회를 세척한 후, hydrogen peroxidase substrate solution을 첨가하여

발색하며 충분히 발색된 후 반응 정지액을 첨가하여 발색을 중지시킴. 발색정도는 ELISA reader기를 이용하여 Optical density(OD)값을 측정.

<표 27> 시범 농장 3곳의 1일령 및 출하전 혈청시료에 대한 IBV ELISA titer 결과

	채취 시기	평균 S/P ratio	평균 ELISA titer	ELISA 결과
A 농장	1일령	2.2±0.8	4829	10/10
	28일령	0.3±0.2	730	5/10
B 농장	1일령	1.3±0.5	2801	9/9
	28일령	0.4±0.4	925	5/10
C 농장	1일령	1.8±1.1	5200	10/10
	28일령	0.3±0.3	949	5/10

○ 그 결과, 시범 농가 3곳의 1일령 육계의 IBV에 대한 항체가는 모두 양성으로 확인됨. 이후 출하 시기인 28일령에는 소실되어, 50% 정도의 가검 혈청만이 제조사에서 제시하는 양성기준(ELISA titer >641)을 만족함.

○ 시범농가에서 채취한 혈청에 대한 기타 국내 시판 IBV ELISA kit 및 중화시험과의 비교 분석은 현재 진행중인 상태임.

○ 대부분의 백신 접종이 1~2회로 끝나는 육계 농장의 특성을 감안하여, 1차년도에 1일령 SPF 닭에 ND+IB 합계백신 분무를 진행한 혈청 항체가 결과값과 비교 분석을 실시. 1차년도 실험 결과, 1일령 분무 후 2주차 항체 검사 결과 시 10마리 중 5마리만이 동일한 IBV ELISA kit에서 양성 판정(50%)을 확인. 또한, NDV의 경우 1일령 SPF에 분무 접종 2주 후, 적혈구응집억제반응시험(HI test)에서 100%의 양성값을 확인함. 육계의 경우 모체이행항체의 간섭이 존재하여 SPF에서의 결과값과 상이한 결과를 보이는 것으로 사료됨.

○ 중화시험 및 국내 시판 ELISA kit에 대한 추가적인 시험이 완료된 후, 육계의 출하시 IBV, NDV의 목표항체가 및 균일도를 분석할 예정.

사. 산란계/중계 농장 대상 IBV, NDV 항체가 추이 분석

○ 시범 농가 3곳을 설정하여 농가 한 계군 이상을 대상으로 1일령부터 출하전까지 시기별로 채혈을 진행하여 NDV 및 IBV에 대한 항체가 분석을 진행함. 시범 농가 3곳의 백신프로그램은 다음과 같음.

<표 28> A, B, C 농장 백신프로그램

A 농장 접종일령	백신명	접종방법
1	ND+IB(K2ND)	분무
15	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
30	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
55	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
70	ABBN(달구방 ABBN)	1/2 dose 근육접종
100	ND+IB(BN++)	분무
127	ABEN(달구방 ABEN)	근육접종
127	RING(노빌리스 RING)	근육접종
135	ND+IB(BN++)	분무
189	IB(B+)	분무
231	IB(B+)	분무
273	IB(B+)	분무
315	IB(B+)	분무
357	IB(B+)	분무
399	IB(B+)	분무
441	IB(B+)	분무

B농장 접종일령	백신명	접종방법
1	ND+IB(K2ND)	분무
15	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
30	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
55	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
70	ABBN(달구방 ABBN)	1/2 dose 근육접종
100	ND+IB(BN++)	분무
127	ABEN(달구방 ABEN)	근육접종
127	RING(노빌리스 RING)	근육접종
140	ND+IB(BN++)	분무
161	IB(B+)	분무
203	IB(B+)	분무
245	IB(B+)	분무
287	IB(B+)	분무
329	IB(B+)	분무
371	IB(B+)	분무
413	IB(B+)	분무

C농장 접종일령	백신명	접종방법
1	ND+IB(K2ND)	분무
15	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
30	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
55	ND+IB(Ma5/Clone30)	분무
70	ABBN(달구방 ABBN)	1/2 dose 근육접종
100	ND+IB(BN++)	분무
127	ABEN(달구방 ABEN)	근육접종
127	RING(노빌리스 RING)	근육접종
140	ND+IB(BN++)	분무
189	IB(B+)	분무
231	IB(B+)	분무
273	IB(B+)	분무
315	IB(B+)	분무
357	IB(B+)	분무
399	IB(B+)	분무
441	IB(B+)	분무
483	IB(B+)	분무

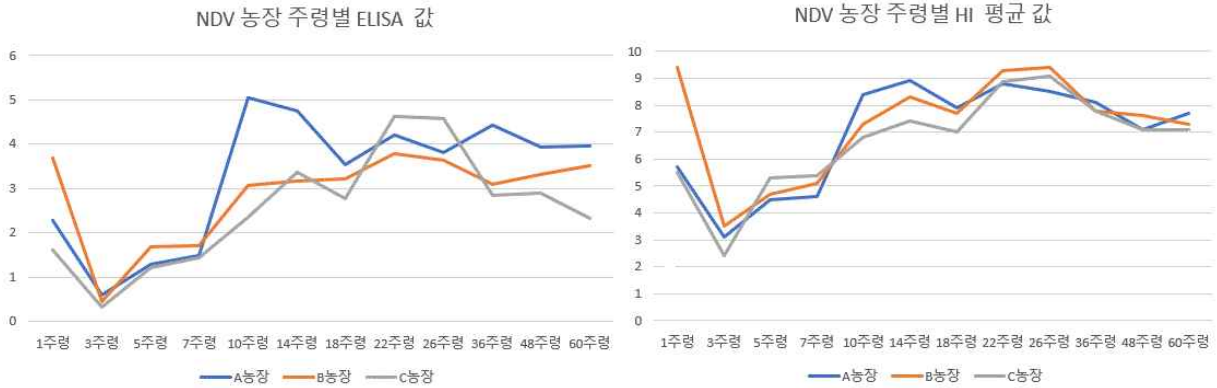
(1) 산란계/종계 농장 NDV 항체가 추이 분석

○ NDV는 혈구응집 억제반응(HI test)으로 항체역가를 검사를 실시하였음. 96 well microplate 전체에 멸균된 Phosphate buffered saline (PBS)을 각각 25 μ l씩 넣은 후, 시범농가에서 채취된 시료의 혈청을 25 μ l씩 A①~H① well에 주입하였으며, 이를 2진 희석하여 4HA unit 항원을 전 well에 넣고 잘 흔들어 준 후 실온에서 30분간 반응시킴. 이후 닭 뉴캐슬병 항체가 없는 닭에서 채혈한 혈액을 동량의 Alseiver's 액을 가하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액과 백혈구를 제거시킨 후, PBS를 사용해 3회 이상 세척한 후 침전된 적혈구 용적을 감안하여 닭 적혈구가 1%가 함유되도록 PBS에 부유시킴. 제작된 1% 적혈구를 25 μ l씩 전 well에 주입한 후 plate를 잘 흔들고, 실온에서 40분간 반응시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰. 양성 혈청또한 동일한 방법으로 시행하였으며, 결과의 판독은 HI titer 2이상을 양성으로 함. HI titer는 log₂ 값으로 산출하였음.

○ 산란계는 육계와 다르게 오랜 기간 동안 사육함. 오랜 기간 동안 야외주 감염으로부터 예방하기 위해 생독백신 접종 후 사독백신으로 1차 또는 2차 부스팅하여 높은 항체가를 유지함. 본 실험 결과, 모체이행항체 시기가 떨어지는 시기에 HI 평균 titer 3~4를 나타내며 주령이 높아질수록 부스팅으로 야외주 감염으로부터 방어할 수 있는 높은 항체가를 유지하는 것을 모든 농장에서 확인할 수 있었음.

<표 29> 시범농가 3곳의 시기별 혈청시료에 대한 NDV 혈청학적 검사 결과

A농장	BioChek NDV ELISA Kit		NDV HI		B농장	BioChek NDV ELISA Kit		NDV HI		C농장	BioChek NDV ELISA Kit		NDV HI	
	평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과		평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과		평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과
1주령	2.27±1.03	10/10	5.7	10/10	1주령	3.70±0.46	10/10	9.4	10/10	1주령	1.62±0.48	10/10	5.5	10/10
3주령	0.59±0.22	8/10	3.1	10/10	3주령	0.46±0.11	9/10	3.5	10/10	3주령	0.33±0.16	6/10	2.4	10/10
5주령	1.29±0.93	8/10	4.5	10/10	5주령	1.68±1.13	9/10	4.7	10/10	5주령	1.21±0.94	7/10	5.3	10/10
7주령	1.49±1.16	10/10	4.6	10/10	7주령	1.71±0.64	10/10	5.1	10/10	7주령	1.45±0.50	10/10	5.4	10/10
10주령	5.05±1.06	10/10	8.4	10/10	10주령	3.06±0.76	10/10	7.3	10/10	10주령	2.35±1.74	9/10	6.8	10/10
14주령	4.71±0.45	10/10	8.9	10/10	14주령	3.17±0.53	10/10	8.3	10/10	14주령	3.38±1.46	10/10	7.4	10/10
18주령	3.54±0.64	10/10	7.9	10/10	18주령	3.22±0.74	10/10	7.7	10/10	18주령	2.78±0.81	10/10	7.0	10/10
22주령	4.21±0.84	10/10	8.8	10/10	22주령	3.78±0.28	10/10	9.3	10/10	22주령	4.62±0.50	10/10	8.9	10/10
26주령	3.81±1.11	10/10	8.5	10/10	26주령	3.83±0.37	10/10	9.4	10/10	26주령	4.59±0.50	10/10	9.1	10/10
36주령	4.42±0.42	10/10	8.1	10/10	36주령	3.09±0.44	10/10	7.8	10/10	36주령	2.86±0.70	10/10	7.8	10/10
48주령	3.94±0.58	10/10	7.1	10/10	48주령	3.31±0.56	10/10	7.6	10/10	48주령	2.89±0.86	10/10	7.1	10/10
60주령	3.96±0.90	10/10	7.7	10/10	60주령	3.51±0.36	10/10	7.3	10/10	60주령	2.34±0.39	10/10	7.1	10/10



<그림 72> 시범농가 3곳의 시기별 혈청시료에 대한 NDV 항체가 추이 분석 그래프

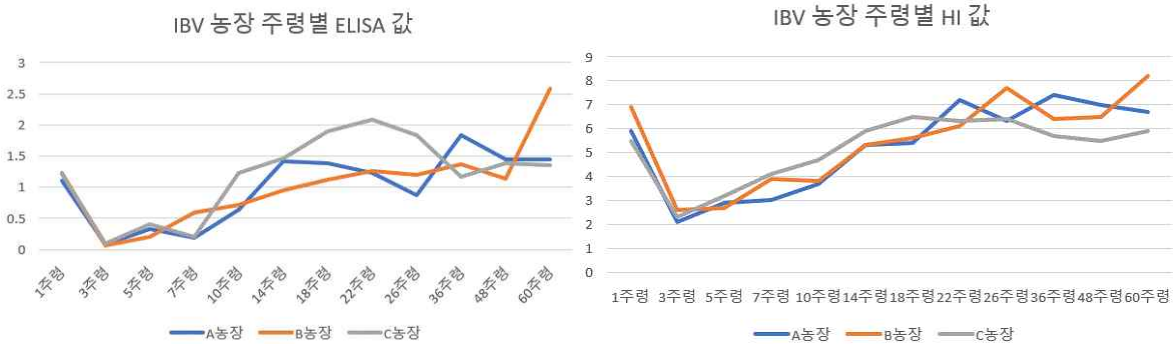
(2) 산란계/종계 농장 IBV 항체가 추이 분석

○ IBV는 Biochek IBV ELISA kit를 사용하여 kit의 방법에 준하여 항체를 분석함. 먼저 희석용 96 well plate의 각 well에 시험 농장에서 채취된 시기별 혈청을 6 μ l를 넣어 희석용액을 이용하여 희석하고, 표준 음성 및 양성혈청 또한 동일하게 희석. 이후, IBV 항원이 코팅된 메디안 디노스틱사의 IBV ELISA plate의 각 well에 희석용액을 분주한 후, 상온에서 30분간 반응시킴. 그 후, 반응액을 제거한 후 멸균된 Phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척(washing)함. 이후, peroxidase conjugated anti-chicken IgG를 각 well에 첨가하여 반응시킴. 다시 세척용액을 이용해 3회를 세척한 후, hydrogen peroxidase substrate solution을 첨가하여 발색하며 충분히 발색된 후 반응 정지액을 첨가하여 발색을 중지시킴. 발색정도는 ELISA reader기를 이용하여 Optical density(OD)값을 측정함.

○ NDV 결과와 유사하게 모체이행항체 시기가 떨어지는 시기에 HI 평균 titer 2~3을 나타내며 주령이 높아질수록 사독백신 부스팅으로 야외주 감염으로부터 방어할 수 있는 높은 항체가를 유지하는 것을 모든 농장에서 확인할 수 있음.

〈표 30〉 시범농가 3곳의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

A농장	BioChek IBV ELISA Kit		IBV HI		B농장	BioChek IBV ELISA Kit		IBV HI		C농장	BioChek IBV ELISA Kit		IBV HI	
	평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과		평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과		평균 S/P ratio	ELISA 결과	HI 평균	HI 결과
1주령	1.11±0.65	9/10	5.9	8/10	1주령	1.23±0.18	10/10	6.9	10/10	1주령	1.21±0.53	10/10	5.5	9/10
3주령	0.08±0.08	1/10	2.1	0/10	3주령	0.06±0.06	0/10	2.6	0/10	3주령	0.10±0.07	1/10	2.3	0/10
5주령	0.32±0.16	7/10	2.9	1/10	5주령	0.20±0.24	4/10	2.7	0/10	5주령	0.41±0.35	6/10	3.2	1/10
7주령	0.18±0.16	4/10	3.0	1/10	7주령	0.59±0.22	10/10	3.9	3/10	7주령	0.20±0.19	4/10	4.1	3/10
10주령	0.63±0.64	5/10	3.7	4/10	10주령	0.72±0.31	9/10	3.8	3/10	10주령	1.23±0.65	9/10	4.7	6/10
14주령	1.42±0.51	10/10	5.3	8/10	14주령	0.94±0.41	10/10	5.3	9/10	14주령	1.46±0.61	10/10	5.9	10/10
18주령	1.39±0.62	10/10	5.4	8/10	18주령	1.12±0.46	10/10	5.6	9/10	18주령	1.89±0.80	10/10	6.5	10/10
22주령	1.23±0.59	10/10	7.2	10/10	22주령	1.26±0.37	10/10	6.1	10/10	22주령	2.08±0.65	10/10	6.3	10/10
26주령	0.87±0.35	10/10	6.3	9/10	26주령	1.20±0.41	10/10	7.7	10/10	26주령	1.84±0.68	10/10	6.4	10/10
36주령	1.83±0.60	10/10	7.4	10/10	36주령	1.37±0.42	10/10	6.4	10/10	36주령	1.16±0.43	10/10	5.7	9/10
48주령	1.45±0.44	10/10	7.0	10/10	48주령	1.13±0.49	10/10	6.5	10/10	48주령	1.38±0.44	10/10	5.5	8/10
60주령	1.44±0.61	10/10	6.7	10/10	60주령	2.58±0.53	10/10	8.2	10/10	60주령	1.35±0.47	10/10	5.9	9/10



〈그림 73〉 시범농가 3곳의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 항체가 추이 분석 그래프

○ 결과를 취합해본 결과, NDV, IBV 모두 모체이행항체가 떨어지는 시기인 3주령에 항체 역가가 낮게 나왔으며 사독백신 부스팅으로 점차 증가하여 ELISA 및 HI 결과에서 모두 양성으로 확인됨. 이는 모든 IBV 양성샘플이 3-5주령에 나온 피해현황 분석결과와 상동함. 추가로, IBV 그리고 NDV 모두 Hi titer 값 5.0 이상에서 상용화되어 있는 ELISA 키트 100% 양성으로 검출됨. 이로 인해, 산란계/종계는 모체이행항체가 떨어지는 시기에 적절한 백신접종 프로그램을 통해 야외주 감염으로부터 방어해야함.

아. 개발된 ELISA kit를 이용한 산란계/종계 IB, ND 생독백신 목표항체가 및 균일도 제시

○ IB K-II group 백신 접종한 계군과 NDV 7형 백신 접종한 계군을 선정하여 시기별 야외임상 혈청시료를 통해 개발된 ELISA kit의 효능을 측정하였음.

(1) 산란계/종계 농장 IBV 생독백신 목표항체가 및 균일도 제시

○ 본 연구결과에 적용된 시험 농가의 백신프로그램은 다음과 같다.

<표 31> 시범농가 3곳의 IBV 백신접종 프로그램

접종일령	농가 A 백신명	IBV strain	접종일령	농가 B 백신명	IBV strain
1일령	ND+IB	K2(KM91 type)	1일령	ND+IB	K2(KM91 type)
20일령	IB(B+)	K2(KM91 type)	20일령	IB(B+)	K2(KM91 type)
30일령	ND+IB	Mass type	30일령	ND+IB	Mass type
55일령	IB(B+)	K2(KM91 type)	55일령	IB(B+)	K2(KM91 type)
70일령	ABENQ	K2 + QX	70일령	ABENQ	K2 + QX
100일령	ND+IB	Mass type	100일령	ND+IB	Mass type
127일령	ABENQ	K2+QX	127일령	ABENQ	K2+QX
127일령	RING	M41	127일령	RING	M41
140일령	IB(B+)	K2(KM91 type)	140일령	IB(B+)	K2(KM91 type)

접종일령	농가 C 백신명	IBV strain
1일령	ND+IB	K1 type
5일령	ND+IB	K2(KM91 type)
20일령	ING	M41
28일령	IB	K2(KM91 type)
63일령	ANBBE-Q	Mass type + K40/09 type
105일령	ANBBE-Q	Mass type + K40/09 type
126일령	RING	M41
196일령	IB	K2(KM91 type)
266일령	IB	K2(KM91 type)
336일령	IB	K2(KM91 type)

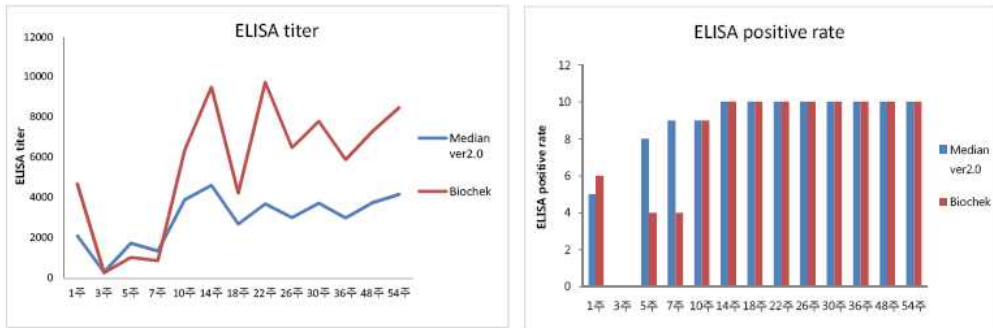
○ 시범농가 3곳으로부터 혈청샘플을 수령하여 BioChek, Median QX ELISA 키트 및 HI를 통해 혈청학적 검사를 진행하였다. 그 결과, 농가 A와 B에서는 모체이행항체가 소실되는 시점까지 1주령 및 3주령에서 ELISA 키트 모두 유사한 양성률을 보였지만, 이후 7주령까지 K2 백신접종으로 인한 항체가 양성율이 Median QX 키트가 BioChek 보다 빠른 양성전환율을 보여 현재 주로 사용되는 국내 백신주 및 야외주인 K-II group IBV에 대해 Median 키트는 민감도가 높은 것을 확인할 수 있음. 그 이후로는 사독백신 부스팅으로 ELISA 키트 모두 100% 양성율을 보였음. 본 결과와 이전 항체가 추이 분석 데이터 결과를 토대로 산란계/종계는 모체이행항체 소실되는 시기인 3주령에 IBV 감염에 취약하다는 것을 알 수 있으며 적절한 백신 프로그램이 요구

됨. 농가 C에서는 ELISA 키트간 큰 차이점을 보이지 않음.

○ 본 연구를 통해 제작된 Median QX ELISA 키트는 ELISA titer 3000 이상의 값을 유지하는 양성 균일도를 확인할 수 있음.

<표 32> 농가 A의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

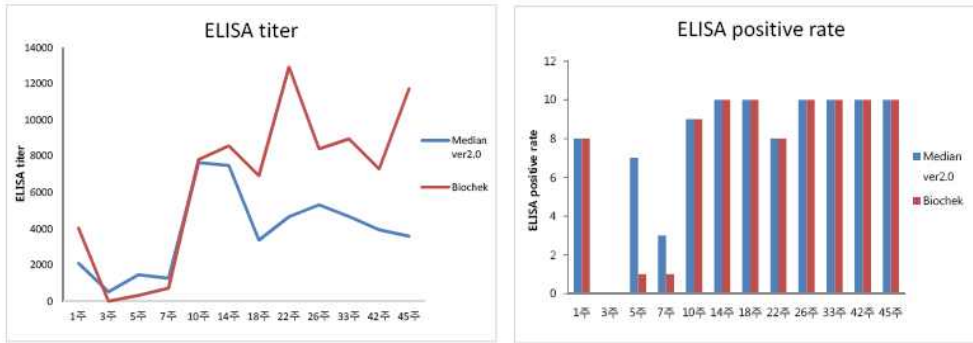
농가 A 주령	BioChek IBV ELISA Kit		Median QX ELISA Kit	
	ELISA titer	ELISA 결과	ELISA titer	ELISA 결과
1 주령	4699	6/6	2564	5/6
3 주령	277	0/10	120	0/10
5 주령	1033	4/10	2068	8/10
7 주령	876	4/10	1544	9/10
10 주령	6365	9/9	4973	9/9
14 주령	9509	10/10	5950	10/10
18 주령	4226	10/10	3349	10/10
22 주령	9750	10/10	4703	10/10
26 주령	6492	10/10	3776	10/10
30 주령	7806	10/10	4745	10/10
36 주령	5898	10/10	3756	10/10
48 주령	7311	10/10	4789	10/10
54 주령	8497	10/10	5343	10/10



<그림 74> 농가 A의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

<표 33> 농가 B의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

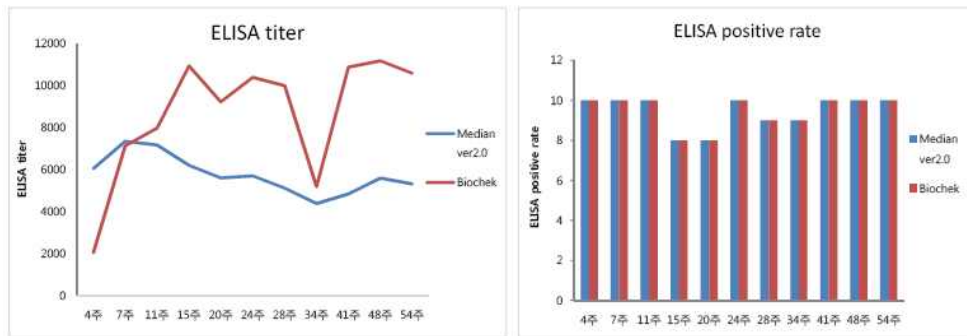
농가 B 주령	BioChek IBV ELISA Kit		Median QX ELISA Kit	
	ELISA titer	ELISA 결과	ELISA titer	ELISA 결과
1 주령	4053	8/8	2539	8/8
3 주령	0	0/9	412	0/9
5 주령	327	1/9	1690	7/9
7 주령	723	1/6	1418	3/6
10 주령	7812	9/9	5982	9/9
14 주령	8571	10/10	6185	10/10
18 주령	6930	10/10	4258	10/10
22 주령	12927	8/8	5998	8/8
26 주령	8409	10/10	6881	10/10
33 주령	8958	10/10	6016	10/10
42 주령	7795	10/10	5027	10/10
45 주령	11747	10/10	4550	10/10



<그림 75> 농가 B의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

<표 34> 농가 C의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

농가 C 주령	BioChek IBV ELISA Kit		Median QX ELISA Kit	
	ELISA titer	ELISA 결과	ELISA titer	ELISA 결과
4 주령	2030	10/10	6037	10/10
7 주령	7121	10/10	7342	10/10
11 주령	7980	10/10	7165	10/10
15 주령	10935	8/8	6195	8/8
20 주령	9221	8/8	5591	8/8
24 주령	10388	10/10	5690	10/10
28 주령	9991	9/9	5105	9/9
34 주령	5180	9/9	4373	9/9
41 주령	10880	10/10	4828	10/10
48 주령	11180	10/10	5581	10/10
54 주령	10589	10/10	5309	10/10



<그림 76> 농가 C의 시기별 혈청시료에 대한 IBV 혈청학적 검사 결과

(2) 산란계/종계 농장 NDV 생독백신 목표항체가 및 균일도 제시

○ 본 연구결과에 적용된 시험 농가의 백신프로그램은 다음과 같음.

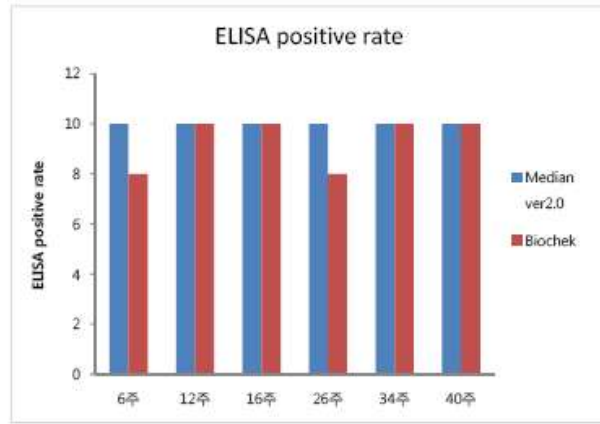
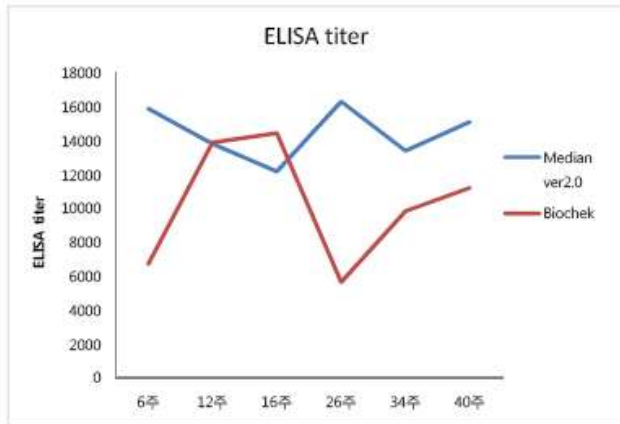
<표 35> 시범농가의 NDV 백신접종 프로그램

접종일령	농가 A 백신명	NDV strain
1일령	달구방 BN++	Type 7
3일령	감보로-BPL2	Type 2
17일령	달구방 BN++	Type 7
56일령	달구방 ABEN	Type 2
90일령	달구방 BN++	Type 7
100일령	달구방 PABEN-Q	Type 2

○ 시범농가로부터 혈청샘플을 수령하여 BioChek, Median NDV 7형 ELISA 키트 및 HI를 통해 혈청학적 검사를 진행하였다. 시범농가는 NDV 2형 및 7형 백신을 접종하였다. 그 결과, Median NDV 7형 ELISA는 모두 양성으로 확인되어 균일도가 높은 것을 확인할 수 있는 반면, BioChek 키트는 양성률 변동이 있었음. 산란계/종계에서 생독 백신 후 사독백신 부스팅으로 6주령부터 Median NDV 7형 ELISA 키트는 10,000 이상의 항체역가가 측정되며 높은 균일도의 양성율을 보였다.

<표 36> 농가 시기별 혈청시료에 대한 NDV 혈청학적 검사 결과

농가 A 주령	BioChek NDV ELISA Kit		Median NDV 7형 ELISA Kit	
	ELISA titer	ELISA 결과	ELISA titer	ELISA 결과
6 주령	6718	8/10	15911	10/10
12 주령	13898	10/10	13829	10/10
16 주령	14459	10/10	12201	10/10
26 주령	5670	8/10	16323	10/10
34 주령	9855	10/10	13442	10/10
40 주령	11226	10/10	15128	10/10



<그림 77> 농가 시기별 혈청시료에 대한 NDV 혈청학적 검사 결과

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표

1. 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 진단, 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 개발
 - 전세계적으로 유행하는 신규 변이주에 대한 진단이 가능한 IB ELISA kit 개발
 - 국내 판매중인 ND genotype들에 대한 진단 민감도 개선 ELISA kit 개발
2. 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(뉴모바이러스, 닭전염성기관지염 바이러스)의 모니터링 시스템 개발 및 피해 현황 조사
 - 항원 검사 방법 설정 (항원배양방법과 realtime PCR간의 검출능 비교 평가)
 - 적정 검사시기 제시
 - 육계, 산란계/종계 농장을 대상으로 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 혈청 및 항원 진단 검사를 진행
3. 닭 전염성기관지염(IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시
 - 동물실험을 통한 IB, ND 생독백신의 종류별/접종방법별 목표 항체가 확인
 - 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정
 - 산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정
 - 육계 산란계 대상 IB, ND 백신 후 항체역가 표준안 제시 및 항체진단 표준 검사법 제시
 - 육계 - 산란계/종계 농장 대상 longitudinal study를 통한 주기별 바이러스 감염 정도 모니터링 평가

제 2 절. 목표 달성여부

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 (메디안)	뉴캐슬병 (ND) ELISA kit 민감도 개선	민감도가 개선된 ND ELISA kit 개발	50%	100%
		국내 백신주에 대한 기존 ELISA kit 대비 항체 양성 진단율 개선	50%	100%
	닭 전염성기관지염 (IB) 변이주 진단 ELISA kit 개발	QX type IBV 진단 키트 개발	50%	100%
		시험 시료에 대한 QX type IBV 진단 평가	20%	100%
		야외 감염시료에 대한 QX type IBV 진단 평가	30%	100%
협동1 (카브)	국내 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭 전염성기관지염바이러스 (IBV)의 모니터링 시스템 개발 및 피해현황 조사	AMPV IBV 항원 진단 SOP 작출	30%	100%
		국내 육계, 산란계대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 바이러스 감염 분석	20%	100%
		국내 육계, 산란계 aMPV, IBV 발생 현황 파악 및 분리주 유전자 분석	50%	100%
협동2 (바이오엔텍)	닭 전염성기관지염 (IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 ELISA flock profiling 표준안	IB 야외감염 및 국내 백신주에 대한 혈청학적 진단방법 제시	20%	100%
		국내 사용 ND 백신 종류에 따른 항체진단 방법 제시	20%	100%
		국내 육계, 산란계 농장 대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 항체가 추이 분석	20%	100%
		육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시	10%	0%
		산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시	10%	100%
		산란계 산란 주기별 (산란전, peak, 후기) 목표 항체가 및 균일도 제시	20%	100%

제 3 절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

1) 특허 등록 성과 미달성

- 본 과제는 과제 기간 내 특허 등록 1건, 과제 기간 후 특허 등록 1건 등 총 2건의 특허 등록 성과가 잡혀있었으나, 특허 출원 1건의 성과가 2년차 말에 발생되면서 과제 종료일까지 특허 등록 1건 달성에 실패함.
- 특허 출원 1건은 2018년 말에 되어 있어 2020년 안에 등록이 될 것으로 보이며, 나머지 특허 출원 1건은 2020년 초에 되어 있어 계획 상의 2022년 안에 등록이 될 것으로 보여 미달성 특허등록 성과를 달성할 수 있을 것으로 보임.

2) 논문 성과 미달성

- 본 과제는 SCI 4건, 비SCI 2건 등 총 6건의 논문 성과가 잡혀있었으나, 주요 연구 개발 성과가 3년차 말에 발생되면서 과제 종료일까지 논문 성과의 달성(SCI 0건, 비SCI 2건 달성)에 실패함.
- 현재 국내 비 SCI 저널(한국가금학회지, 대한수의학회지)에 2건은 가금학회지에 등록완료되었으며, 해외 SCI 저널(Poultry Science)에 1건은 투고 하였으며 리뷰 대기중임.
- 제작된 엘라이자 키트 효능검증과 호흡기성 질병 관련으로 미달성 논문 성과를 달성할 수 있도록 할 것임.

3) 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시

- 현재 대부분의 육계농가는 혈청시료를 보관하지 않고 도축장에서 혈청샘플을 통해 항체가 역가를 확인함. 개발된 ELISA kit의 목표 항체가 및 균일도 제시를 위해 미리 육계농가에 요청하여 종료 1년차 이내에 성과를 달성할 수 있도록 할 예정임.

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 기대 성과 및 기대 효과

1. 기술적 측면

- 닭 전염성기관지염(IB)은 변이가 많이 일어나는 특성으로 인해 그동안 진단에 어려움을 겪고 있었으므로 변이주에 대한 ELISA kit를 개발함으로써 진단이 훨씬 용이해질 것으로 예상됨.
- 뉴캐슬병 (ND)는 국내 백신주의 다양화에 따라 그동안 진단에 어려움을 겪고 있었으므로 진단 민감도가 높아진 ELISA kit를 개발함으로써 진단이 훨씬 용이해질 것으로 예상됨.
- 기존 ELISA kit는 제조사별 항체검사의 양성률 기준이 달라 혼선을 초래했으므로, 제조사별 항체검사 kit 양성률 조정 및 표준화를 통해 이를 해소할 수 있을 것으로 보임.
- 현재 시판되고 있는 ELISA kit는 국내에 발생하고 있는 닭 전염성기관지염과 혈청형이 맞지 않아 정확한 항체 측정이 어려우므로 신규 ELISA kit의 개발을 통해 항체 측정에 대한 문제점을 개선할 수 있음
- 한 다국적 업체의 진단키트의 경우 백신 종류와 접종 경로에 따라 예상 항체가를 제시하고 있지만 국내에서 주로 발생하는 혈청형에 대한 정보는 포함하고 있지 않으므로 본 연구를 통해서 국내 실정에 적합한 매뉴얼을 제시할 수 있음.
- 산란계 및 육계 농장에 대한 호흡기질병의 주기적인 항원과 항체 검사를 통해 현황 조사를 실시할 수 있으며 이를 바탕으로 호흡기 질병에 대한 모니터링 SOP를 작성 가능함.

2. 경제적 산업적 측면

- 닭 전염성기관지염(IB)과 뉴캐슬병 (ND)의 다국적 회사 제품의 경우 국내 백신 혈청형에 적합하지 않으므로 국내회사의 신규 ELISA kit 개발을 통해 관련 산업의 경쟁력을 갖출 수 있음.
- 해당 호흡기질병의 경우 대부분 급성으로 진행되는 양상을 나타내므로 정확한 항원 및 항체 검사를 통해 조기에 예방에 대한 효과가 클 것으로 기대됨.
- 뉴캐슬병은 폐사율과 이환율이 높은 급성 전염병에 해당하며 발생시 수출입이 제한되는 질병이다. 또한, 닭 전염성기관지염과 닭 뉴모바이러스 감염증의 경우 닭의 산란저하를 일으키는 질병이므로 정확한 항원 및 항체 검사로 이에 대한 경제적 피해를 막을 수 있음.



<그림 1> 닭 뉴모바이러스에 의한 외부 난질의 저하

- 국내 발생현황 파악이 미비한 닭 호흡기질병의 주기적인 예찰을 통하여 질병 전파발생을 효과적으로 차단하여 양계농가의 경제적 피해 최소화 및 경제활동 안정화를 기대할 수 있음.

제 2 절. 개발 결과의 활용 방안

1. 현장적용, 제품화

- 개발된 ELISA kit에 대한 국내 등록업무와 판매 진행 예정
- 해당 ELISA kit와 함께 항체검사 표준안을 이용하여 국내 양계 현장에서 백신 평가를 위한 도구로 홍보
- 개발된 IBV ELISA kit는 QX-type에 대한 진단이 가능한 유일한 kit임. QX-type IBV로 큰 피해를 보고 있는 아시아 및 유럽으로의 수출 방안 모색

2. 정책제안

- 개발된 항체검사 표준안 및 항원진단 모니터링 기법은 정책 제안을 진행하여 국가 방역정책에 도움을 주고자 함.

3. 후속연구

- 닭 뉴모바이러스 감염증(aMPV) 분리주 분석을 통한 한국형 생독백신주 개발 연구 진행

붙임. 참고문헌

1. Song C.S et al., Detection and classification of infectious bronchitis viruses isolated in Korea by dot-immunoblotting assay using monoclonal antibodies Avian Dis, 1998, 42, 92-100
2. Kwon J.S et al., Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea
3. Mark W. Jackwood et al., Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens, Journal of Virological Methods, 2006
4. Kong et al, Proteomic analysis of purified coronavirus infectious bronchitis virus particles, Proteome Science, 2010
5. Koichiro Tamura et al., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, Molecular Biology and Evolution, Volume 24, Issue 8, August 2007, Pages 1596~1599

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 닭 주요 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염 등) 표준 모니터링 기술 개발				
	(영문) Development of Standard Monitoring Methods of Chicken Infectious Respiratory Diseases(IVB, NDV, aMPV)				
주관연구기관	(주)메디안디노스틱		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)메디안디노스틱	
참 여 기 업	(주)카브, 바이오엔텍			(성명) 정 광 면	
총연구개발비 (1,100,040천원)	계	1,100,040	총 연구 기간	2017. 04. 01 ~ 2019. 12. 31(2년9월)	
	정부출연 연구개발비	825,000	총 참 연 구 원 수	총 인원	18명
	기업부담금	275,040		내부인원	8명
	연구기관부담금			외부인원	10명
<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 목표 및 성과 ○ 연구개발 목표 <ul style="list-style-type: none"> ○ 닭 전염성기관지염(IVB) 변이주 진단, 민감도 개선 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 개발 ○ 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(뉴모바이러스, 닭전염성기관지염 바이러스)의 모니터링 시스템 개발 및 피해 현황 조사 ○ 닭 전염성기관지염(IVB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 종류별 및 접종 방법별 ELISA kit flock profiling 표준안 제시 ○ 연구개발 성과 <ul style="list-style-type: none"> ○ 뉴캐슬병(ND) ELISA kit 민감도 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 민감도가 개선된 ND ELISA kit 개발 - 국내 백신주에 대한 기존 ELISA kit 대비 항체 양성 진단율 개선 ○ 닭 전염성기관지염(IVB) 변이주 진단 ELISA kit 개발 <ul style="list-style-type: none"> - QX type IVB 진단 가능 키트 개발 - 시험 시료에 대한 QX type IVB 진단 평가 - 야외 감염시료에 대한 QX type IVB 진단 평가 ○ 국내 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭 전염성기관지염바이러스(IVB)의 모니터링 시스템 개발 및 피해현황조사 <ul style="list-style-type: none"> - aMPV, IVB 항원 진단 SOP 작출 					

- 국내 육계, 산란계 대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 바이러스 감염 분석
- 국내 육계, 산란계 aMPV, IBV 발생현황 파악 및 분리주 유전자분석

○ 닭 전염성기관지염(IB), 뉴캐슬병(ND) 생독백신 ELISA flock profiling 표준안

- IB 야외감염 및 국내 백신주에 대한 혈청학적 진단방법 제시
- 국내 사용 ND 백신 종류에 따른 항체진단 방법 제시
- 국내 육계, 산란계 농장 대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 항체가 추이 분석
- 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시
- 산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시
- 산란계 산란 주기별 (산란전, peak, 후기) 목표항체가 및 균일도 제시

○ 연구내용 및 결과

<제1세부: 신규 IBV 변이주 ELISA검사 kit 개발, 민감도 개선 ND ELISA kit 개발>

1) 신규 IBV 변이주 진단 ELISA kit 개발

- 전세계적으로 널리 퍼져있는 IBV QX-type 혈청형에 대한 진단 ELISA kit 개발
- 변이주 감염 후 기존 ELISA kit와의 항체 검출능 비교 시험

2) 진단 민감도 개선 ND ELISA kit 개발

- 국내 백신주의 genotype들에 대한 민감도가 개선된 ELISA kit 개발
- HI test와의 비교 평가를 통하여 효능 검증

<제1협동: 국내 양계산업의 주요 닭 호흡기질병(aMPV, IBV)의 모니터링 시스템 개발 및 피해현황 조사>

1) 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭 전염성기관지염 바이러스(IBV) 모니터링 시스템 개발

- 농장 별 주기적인 혈청검사를 통하여 가장 효율적인 혈청검사 방법, 주기 설정을 통한 SOP 개발
- 항원 진단이 어려운 바이러스로 realtime PCR, 항원 분리배양 등의 방법을 비교하여 최적의 모니터링 SOP 개발

2) 산란계, 육계 농장에 대한 주요 호흡기질병 발생 현황 조사 및 예방대책 수립 제시

- 산란계, 육계농장 대상 시험농가를 3곳 이상 선정하여 전 주기에 걸친 longitudinal study를 진행하여 항원 및 혈청검사
- 협력 동물병원을 통한 시료 수집 및 호흡기질병 발생 현황 조사
- 수집된 질병 발생현황 및 개발된 모니터링시스템을 통하여 호흡기 질병 모니터링 SOP 작성

<제2협동 : IB, ND 생독백신 ELISA 검사 표준안 제시>

1) 동물실험을 통한 IB, ND 생독백신의 종류별 목표항체가 표준안 제시

- SPF 닭 대상으로 시판중인 IB, ND 생독백신 접종 후 목표 항체가 제시

2) 본 과제에서 개발된 ELISA kit를 이용한 IB, ND 생독백신 목표항체가 표준안 제시

- 산란계, 육계농장 대상 시험농가를 선정하여 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 항체역가 측정
- 육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정
- 산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 설정
- 산란계 산란 주기별 (산란전, peak, 후기 등) 항체가 표준 설정
- 육계 산란계 대상 IB, ND 백신 후 항체역가 표준안 제시 및 항체진단 표준 검사법 제시

○ 연구성과 활용실적 및 계획

○ 현장적용, 제품화

- 개발된 ELISA kit에 대한 제품화 및 등록업무 진행 예정

- 해당 ELISA kit와 함께 항체검사 표준안을 이용하여 국내 양계 현장에서 백신 평가를 위한 도구로 홍보

- 개발된 IBV ELISA kit는 QX-type에 대한 진단이 가능한 유일한 kit임. QX-type IBV로 큰 피해를 보고 있는 아시아 및 유럽으로의 수출 방안 모색

○ 정책제안

- 개발된 항체검사 표준안 및 항원진단 모니터링 기법은 정책 제안을 진행하여 국가 방역정책에 도움을 주고자 함.

○ 후속연구

- 닭뉴모바이러스 감염증(aMPV) 분리주 분석을 통한 한국형 생독백신주 개발 연구 진행

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	제 농축 2017-74호		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	닭 주요 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염 등) 표준 모니터링 기술 개발		과제유형	(개발)	
연구기관	㈜메디안디노스틱		연구책임자	정광면	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.04.01 - 2017.12.31	225,000	75,000	300,000
	2차연도	2018.01.01 - 2018.12.31	300,000	100,020	400,020
	3차연도	2019.01.01 - 2018.12.31	300,000	100,020	400,020
	4차연도	-	-	-	-
	5차연도	-	-	-	-
	계	2017.04.01 - 2019.12.31	825,000	275,040	1,100,040
참여기업	(주)카브, (주)구울리생명공학원				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2020. 02. 14

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
메디안디노스틱	연구소장	정광면

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

국내 및 국외의 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 (QX type)과 뉴캐슬병 (ND)에 대한 민감도/특이도가 높은 ELISA 진단키트가 없는 상황에서 본 연구를 통해 개발되었음. 또한 국내에서 연구가 미비한 닭 뉴모바이러스의 실제적인 유전자 정보를 획득하였으며, 국내에서 피해를 일으키고 있는 실제적인 바이러스의 분리 역시 성공하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

본 연구를 통해 개발된 ELISA 진단키트를 사용하여 유일한 IBV QX 백신역가 측정과 필수적으로 하게 되어 있는 NDV 역가 측정에 좀 더 정확한 결과를 얻음으로써 농장주와 백신회사간의 백신 성능에 대한 결과를 좀 더 정확하게 측정할 수 있을 것으로 사료됨. 또한 본 연구를 통해 개발되어진 닭 뉴모바이러스 SOP는 현재까지 동정의 어려움으로 인해 정확한 국내 발생주 파악이 어려웠던 문제점을 해소해줄 수 있을 것으로 생각되며, 이를 통한 백신 개발은 나아가 질병으로 인한 피해를 최소화할 수 있을 것으로 사료됨. 또한, 백신 접종 후 목표 항체가 설정으로 백신 접종 후 적절한 항체가 미생성 시 빠른 후속대책 마련으로 피해를 최소화 할 수 있을 것임.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

본 연구를 통해 개발된 ELISA 진단키트를 사용하여 IBV QX 백신역가 측정과 필수적으로 하게 되어 있는 NDV 역가 측정에 사용할 수 있을 것으로 사료됨. 유행하고 있는 닭 뉴모바이러스의 유전자 분석을 완료할 수 있었으며, 이를 통해 국내에서 아직 개발되어지지 못한 바이러스의 생독백신 및 사독백신 생산이 가능해질 것으로 사료됨. 이를 통해 다양한 질병으로 인한 피해를 최소화할 수 있을 것으로 생각됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

본 연구를 진행하게 위해 다양한 항원과 항체를 제작 및 생산하였으며, 다양한 실험을 통해 우수한 성능을 보이는 진단키트를 제작하고 품목허가를 취득하였고 특허 출원도 진행되었음. 또한 본 연구의 진행을 위해 다양한 농장으로부터 사체를 수거해 바이러스의 분리 동정을 실시하였으며, 실제 사육되고 있는 실용계로부터 채취된 혈액을 이용해 새로이 개발된 ELISA의 평가를 실시하였음. 또한, 다양한 혈청을 이용한 주령별 목표항체가 역시 제시하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (보통)

현재 2건의 ELISA 제품 품목허가를 받았으며, 2건의 특허 출원이 진행되었음. 또한 현재 개발 결과물을 이용한 논문을 Poultry science에 submission하여 리뷰 중에 있으며, 비SCI 2편을 작성하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
민감도가 개선된 ND ELISA kit 개발	10	10	제품 품목허가 완료
국내 백신주에 대한 기존 ELISA kit 대비 항체 양성 진단을 개선	10	10	현재 상용화된 진단키트보다 민감도 상승함
QX type IBV 진단 키트 개발	10	10	제품 품목허가 완료
시험 시료에 대한 QX type IBV 진단 평가	10	10	시험시료 평가 결과 IBV 변이주에 대한 반응성이 좋았음
야외 감염시료에 대한 QX type IBV 진단 평가	10	10	야외 감염 의심시료 평가 결과 감염역가를 잘 반영하였음
AMPV IBV 항원 진단 SOP 작출	9	9	현재까지 진단이 어려웠던 바이러스에 대한 SOP 작성 완료
국내 육계, 산란계대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 바이러스 감염 분석	6	6	국내 농장 시료를 이용한 주요 바이러스 감염 시기 확인 및 이를 통한 항원 진단의 적절한 시기 파악
국내 육계, 산란계 aMPV, IBV 발생현황 파악 및 분리주 유전자 분석	15	15	국내에서 유행하고 있는 바이러스의 strain 파악 완료
IB 야외감염 및 국내 백신주에 대한 혈청학적 진단방법 제시	6	6	strain에 따른 혈청학적 진단 결과 차이와 이를 분석하였으며 적절한 방법 제시
국내 사용 ND 백신 종류에 따른 항체진단 방법 제시	6	6	strain에 따른 혈청학적 진단 결과 차이와 이를 분석하였으며 적절한 방법 제시
국내 육계, 산란계 농장 대상 전 주기에 걸친 longitudinal study를 통한 항체가 추이 분석	6	6	백신 접종 후 농장에서의 항체가 추이 분석 완료
육계 백신 후, 출하시 IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시	3	0	백신 접종 후 야외주에 방어가 가능한 목표항체가 분석 중
산란계 백신 후, IB, ND에 대한 목표항체가 및 균일도 제시	3	3	백신 접종 후 야외주에 방어가 가능한 목표항체가 제시
산란계 산란 주기별 (산란전, peak, 후기) 목표 항체가 및 균일도 제시	6	6	백신 접종 후 야외주에 방어가 가능한 목표항체가 제시
합계	100	97	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

국내 및 국외의 닭 전염성기관지염(IB) 변이주 (QX type)과 뉴캐슬병 (ND)에 대한 민감도/특이도가 높은 ELISIA 진단키트가 없는 상황에서 본 연구를 통해 개발된 점과 국내에서 연구가 미비한 닭 뉴모바이러스의 실제적인 유전자 정보를 획득하였으며, 국내에서 피해를 일으키고 있는 실제적인 바이러스의 분리 역시 성공한 점 등 본 연구의 계획 하에 나온 성과들이 전반적으로 우수한 점을 볼 때 몇 개의 정량적 성과인 논문 등록이 미미한 점을 제외한다면 잘 수행된 연구개발과제라고 사료됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구로 토대로 나온 정량적인 성과들은 추후 등록될 예정인 것들이 있고 논문 성과들이 미흡한 부분은 ELISA 키트 개발이 늦어진 점 등이 영향을 미친 점들을 고려해주시기를 바랍. 또한 정성적/정량적 성과들을 달성하기 위해 성실하게 본 연구를 수행한 점을 고려해주시기를 바랍.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

1) 현장적용, 제품화

- 개발된 ELISA kit에 대한 국내 등록업무와 국내외 판매 진행 예정

2) 정책제안

- 개발된 항체검사 표준안 및 항원진단 모니터링 기법은 정책 제안을 진행하여 국가 방역정책에 반영하고자 노력

3) 후속연구

- 닭 뉴모바이러스 감염증(aMPV) 분리주 분석을 통한 한국형 생독백신주 개발 연구 진행

4) 미 달성 성과 후속조치

- 특히 등록 성과 미달성 부분은 추후 등록될 예정이며, 논문 성과 미달성 부분은 추후 등록될 논문들과 추가 논문 작성으로 미달성 논문 성과를 달성할 수 있도록 할 것임.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	농생명산업기술개발사업
연구과제명	닭 주요 호흡기질병(뉴캐슬병, 닭전염성기관지염 등) 표준 모니터링 기술 개발			
주관연구기관	(주)메디안디노스틱		주관연구책임자	정 광 면
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	825,000천원	275,040천원		1,100,040천원
연구개발기간	2017. 04. 01 - 2019. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
<p>① 국내 닭 뉴모바이러스(aMPV), 닭 전염성 기관지염 바이러스 (IBV)의 모니터링 시스템 개발 및 피해현황 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 유행중인 닭 뉴모바이러스와 전염성 기관지염 바이러스 검출 방법에 대한 SOP를 작성하였으며, 사육중인 실용계를 이용하여 바이러스 감염 여부 분석하였음. 또한, 동정되어진 바이러스를 이용해 국내에서 주로 유행하고 있는 감염주를 판별하였음.
<p>② 닭 전염성 기관지염 (IBV), 뉴캐슬병 (NDV), 생독백신 ELISA flock profiling 표준안 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 닭 전염성 기관지염 진단 시 백신주와 야외주 감별을 위한 프로토콜을 제시하였음. - 국내에 판매되고 있는 뉴캐슬병 바이러스 생백신 및 사독백신 접종 시 항체 생성 정도와 이를 통한 적절한 백신 접종 여부 확인 가능 - 국내에서 사육되고 있는 실용계의 주령별 항체가 분석을 통해 각 질병에 해당하는 항체가 추이를 분석할 수 있었으며, 이를 토대로 적당한 백신 접종 시기 고려 가능 - 닭 전염성 기관지염 및 뉴캐슬병 백신 접종 후 일정량 이상의 항체가 생성이 야외주 감염을 효율적으로 방어할 수 있다는 것을 밝혔으며, 이러한 기준점을 제시하였음. - 산란계에서 백신 접종 후 주령별 항체가 생성 목표를 제시하였으며 이를 충족해야만 효율적인 야외주 방어능 생성이 가능하다는 것을 제시하였음.
<p>③ 신규 IBV 변이주 ELISA검사 kit 개발, 민감도 개선 ND ELISA kit 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 IBV 변이주 ELISA와 민감도 개선 ND ELISA 진단키트를 개발하여 품목허가 완료되었음.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	20				30							20	10			10			
최종목표	2	1				2						4	2	1.0	3			2		
연구기간내 달성실적	2	0				2						0	2		3			2		
달성율(%)	100	0				100						0	100		100			100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	닭 뉴모바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스 모니터링 시스템
②	닭 전염성 기관지염의 야외주 및 백신주 감별 방법
③	백신 접종 후 적절한 목표 항체가 설정
④	신규 IBV 변이주 ELISA검사 kit 개발, 민감도 개선 ND ELISA kit 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					V			V		
②의 기술					V			V		
③의 기술					V			V		
④의 기술					V		V			

* 각 해당란에 v 표시



닭 호흡기질병 (IBV, APV) 항원 진단 방법
SOP

July 2020

KCAV, Inc

주식회사 카브

[닭 전염성기관지염 (Infectious bronchitis virus, IBV)]

1. 개요

닭 전염성기관지염 (Infectious bronchitis, IB)은 IB 바이러스 (Infectious bronchitis virus, IBV)에 의해서 발생하는 전파력이 매우 빠른 닭의 급성 전염병이다. 닭 전염성기관지염 감염 시 폐사율은 높지 않으나 이환율이 높고 기침, 콧물, 증체율 저하, 외부 및 내부 난질저하를 동반하는 산란율 저하를 유발할 뿐만 아니라 호흡기 후유증으로 대장균증이 수반되어 만성폐사가 지속되는 등 매우 다양한 생산성 저하를 유발하여 전세계적으로 양계산업에 막대한 경제적 피해를 입히고 있다.

현재 국내에서 유행하고 있는 닭 전염성기관지염은 심한 호흡기와 산란저하를 주로 유발하는 호흡기형과 호흡기를 동반하나 신장염과 산란저하가 더 심한 신장형 2가지 타입으로 구분할 수 있다. 국내의 닭 전염성기관지염은 1986년도에 보고된 것이 최초이며 1990년도 후반까지 지속적으로 호흡기형의 바이러스가 유행하였으며 그 이후 신장염을 수반하는 신장형 닭 전염성기관지염이 발생되어 지금까지 지역적으로 심한 피해를 유발하고 있는 실정이다.

닭 전염성기관지염은 변이가 쉽게 일어나는 특성으로 인해 다양한 변이주가 존재하며 서로간 교차방어가 성립되지 않아 질병 예방에 많은 어려움이 따르고 있는 실정이다. 따라서, 정확한 후속 처치를 위해 항원 진단을 통한 백신주와 야외주 간의 감별진단이 필수적인 상황이다. 하지만 적절한 채취 샘플 시기와 방법이 특정되어 있지 않아 어려움이 따르고 있다. 따라서, 본 SOP를 통해 닭 전염성기관지염의 항원 진단 시 가장 적절한 샘플 채취 방법에 대한 정의하고자 한다.

2. 샘플 채취

가. 닭 전염성기관지염 감염에 의심되는 개체들은 즉시 부검을 통한 샘플 채취를 실시한다.

- 1) 농장 내 닭 전염성기관지염 의심 육계들의 부검 결과 2-3주령에서 가장 높은 임상증상 발현율을 보이므로 이 시기가 바이러스 채취의 최적시기임.
- 2) 농장 내 닭 전염성기관지염 의심 산란계들의 부검 결과 3-6주령에서 가장 높은 임상증상 발현율을 보이므로 이 시기가 바이러스 채취의 최적시기임.

나. 부검 시 전체적인 병변을 유의 깊게 관찰하며 특이적으로 병변을 보이는 장기를 무균적으로 채취한다.

- 1) 닭 전염성기관지염의 경우 주로 기관과 신장에 병변을 보이므로 위의 장기는 필수적으로 채취하여야 한다.
- 2) 어린 주령에 원인체 감염 시 수란관 낭종이 관찰될 수 있으므로 병변 발현 시 다른 장기와 마찬가지로 무균적인 채취를 실시한다.
- 3) 채취된 샘플은 동결 후 녹일 시에 바이러스 양이 감소할 수 있으므로 채취 즉시 처리를 실시한다.

다. 무균적으로 채취된 샘플을 유발 및 유봉을 이용해 조직 전체를 고르게 유제한 뒤 무게를 측정한다.

라. 측정된 무게의 10배에 해당하는 항생제 함유 PBS (Phosphate Buffered Saline)를 샘플과 혼합하여 준다.

마. 3,000rpm에 10분간 원심분리를 실시한 후 상층액을 채취한 뒤 종란접종을 실시한다.

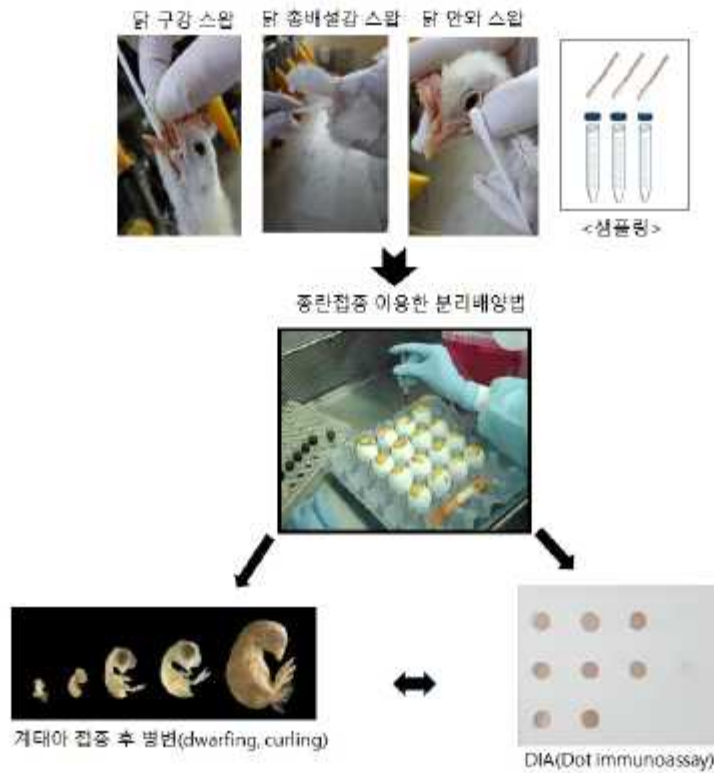
- 1) 채취된 상층액 중 종란 접종을 위한 샘플을 제외한 나머지는 Cryovial tube를 이용해 -70°C 에 저장한다.
- 2) 채취된 상층액을 $0.45\mu\text{m}$ 필터를 이용해 걸러주고 10-11일령 SPF 종란의 요막액에 0.2ml씩 접종한다.

바. 바이러스 접종 후 3일간 종란의 상태를 관찰하며, 3일째 폐사를 제외한 모든 시험
군을 4°C 냉장고에 보관한다.

1) 접종 1일째 폐사한 개체의 경우 접종사로 판단 폐기처리 한다. 2일째에 폐사한 개
체는 바이러스로 인한 폐사로 판단하여 4°C 냉장고에 보관한다.

사. 접종 3일 후 요막액을 채취하여 RNA 추출용 샘플을 제외한 나머지는 Cryovial
tube를 이용해 -70°C에 저장한다.

아. 추출된 RNA는 RT-PCR 또는 Dot-immunoblot assay를 이용해 IBV 유무를 확
인한다.



1) Target gene: Nucleocapsid gene

2) Band size: 316bp

50°C	30min		Primer sequence	
95°C	15min		Forward	5'-TCA TGG CAA GCG GTA AGG-3'
94°C	1min	30 cycles		
55°C	1min			
72°C	1min			
72°C	10min		Reverse	5'-TTC AGG TTA GCG GCT GGT C-3'
15°C	∞			

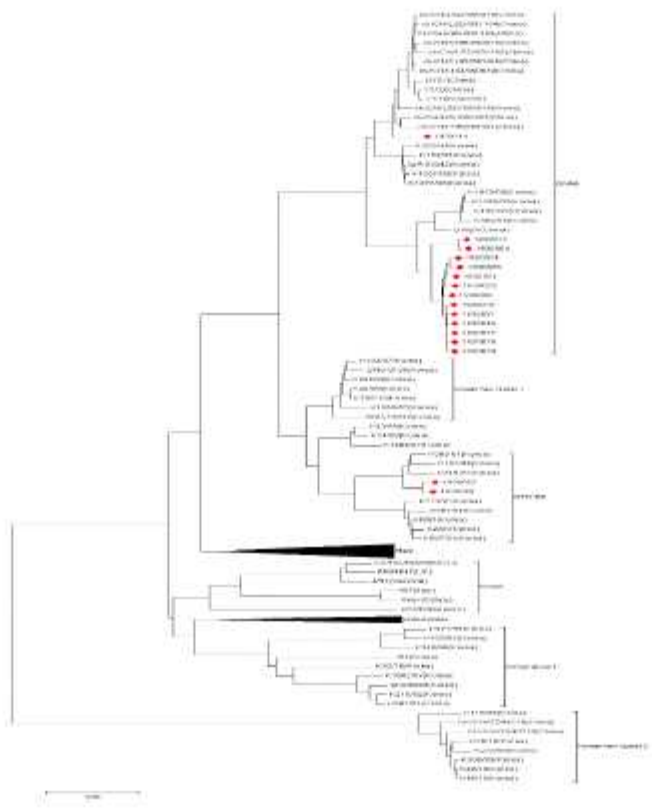
자. IBV 양성으로 확인된 샘플은 정확한 strain 파악을 위하여 genotyping 용 primer 를 이용해 유전자 분석을 실시한다.

1) Target gene: S1 gene

2) Band size: 1,800bp

50°C	30min		Primer sequence	
95°C	15min		Set 1 Primer	
52°C	1.5min	40 cycles	Forward	5'-AGC AAC RCC AGT TGT DAA TTT G-3'
72°C	1.5min		Reverse	5'-CWG TAC CAT TAA CAA ART AAG CMA G-3'
72°C	2min		Set 2 Primer	
72°C	10min		Forward	5'-TGT GTA TTT TAA AGC AGG TGG ACC-3'
15°C	∞		Reverse	5'-GTT TGT ATG TAC TCA TCT GTA AC-3'

카. 유전자 분석을 통해 정확한 genotype을 확인한다.



[조류 메타뉴모바이러스 (aMPV, Avian Metapneumovirus)]

1. 개요

조류 메타뉴모바이러스 (aMPV, Avian Metapneumovirus)는 칠면조와 닭에서 비기관염과 두부종장증을 일으키는 주요 원인체로 알려져 있음. 상기 바이러스는 1986년 최초 분리되어 보고된 이후, 미국, 유럽, 아시아, 중동 및 북아프리카에 이르기까지 전 세계적으로 분포되어 있다. 국내에서는 1992년에 닭에서 두부종장증 소견을 보이는 임상사례와 혈청학적으로 감염된 사례가 확인되어 보고된 바 있으며, 최근 심한 콧물과 탈색란을 동반하는 산란저하 소견을 보이는 육계와 육용종계에서 원인 바이러스가 분리되어 국내 양계 산업의 경제적 피해를 유발하는 주요 질병 중 하나로 재인식되고 있다.

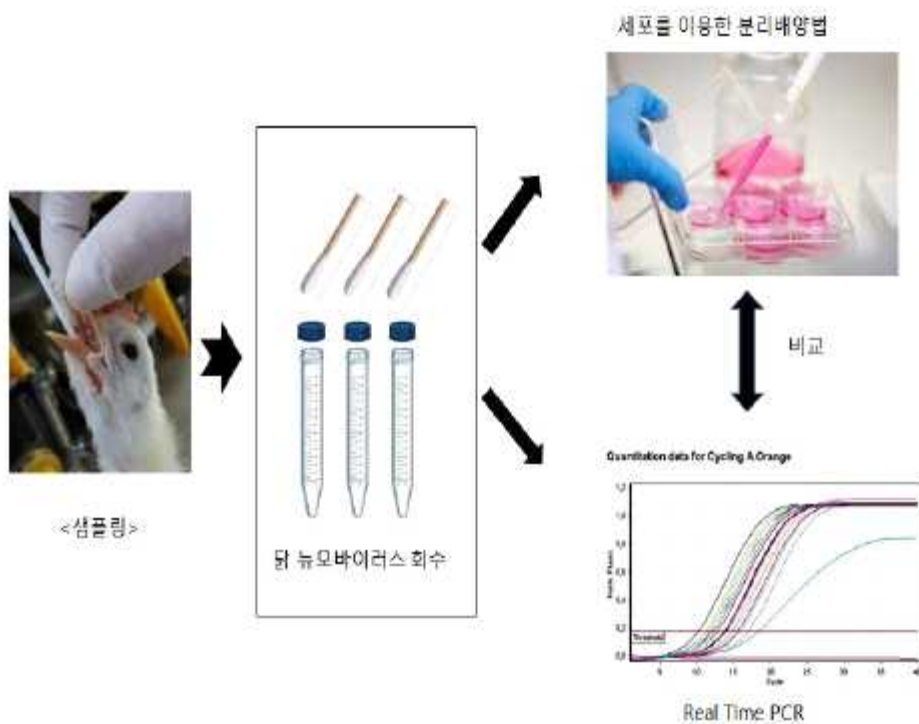
닭의 경우 조류 메타뉴모바이러스 감염 시 폐사율은 그다지 높지 않으나 이환율은 높으며, 특히 심한 콧물을 동반하는 호흡기 증상을 유발하여 산란계의 생산성을 저하시키고 대장균증으로 이환되어 육계의 증체율 감소와 대장균성 복막염으로 인한 폐사의 주요 원인이 되고 있다. 국내 닭에서의 감염 사례는 지속적으로 보고되고 있으며 육계, 산란계, 육용종계에 이르기까지 매우 다양하다.

이 질병을 일으키는 원인체는 단일 혈청형으로 존재하고 있으며, G단백질 유전자 염기서열을 기초로 4개의 유전형 (A, B, C, D)이 존재하고 있는 것으로 보고되었다. 모든 유전형이 발병하는 칠면조와 달리 닭의 경우 A와 B 유전형만이 피해를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 국내에서는 두 가지 유전형 모두 고르게 유행하고 있으므로 효율적인 방어능 확보를 위하여 감염 시 정확한 원인체의 유전형 파악이 매우 중요한 점으로 대두되고 있다.

2. 샘플 채취

가. 조류 메타뉴모바이러스 감염에 의심되는 개체들은 즉시 부검을 통한 샘플 채취를 실시한다.

- 1) 조류 메타뉴모바이러스 항원 분리용 위에서는 구강, 비강 및 비갑개 샘플을 이용할 수 있음.
- 2) 세포 이용 시 구강 및 비강에서는 접종 2일째부터 비갑개에서는 접종 3일째부터 항원이 검출되기 시작하였음. 또한, 비강으로부터의 검출에서 제일 높은 수득률을 확인할 수 있었음.
- 3) Real-time RT-PCR 이용 시 구강, 비강 및 비갑개 모두 접종 1일째부터 항원이 검출되기 시작하여 세포를 이용한 검출능보다 뛰어난 점을 확인할 수 있었음.



나. 부검 시 전체적인 병변을 유의 깊게 관찰하며 특이적으로 병변을 보이는 장기를 무균적으로 채취한다.

- 1) 조류 메타뉴모바이러스의 경우 주로 기관과 비갑개에서 병변을 보이므로 위의 장기는 필수적으로 채취하여야 된다.
- 2) 상기 원인체는 환경 저항성이 낮아 소실 정도가 빠르므로 샘플 채취시기가 매우 중요함.
- 3) 채취된 샘플은 동결 후 녹일 시에 바이러스 양이 감소할 수 있으므로 채취 즉시 처리를 실시한다.
- 4) 무균적으로 채취된 샘플을 항생제 함유 PBS (Phosphate Buffered Saline) 1.5ml 와 혼합하여 준다.

다. 3,000rpm에 10분간 원심분리를 실시한 후 상층액을 채취한 뒤 RNA 추출용 샘플을 제외한 나머지는 Cryovial tube를 이용해 -70°C에 저장한다.

라. 참조논문을 이용해 A type과 B type을 구분할 수 있는 Real-time RT-PCR을 이용한다.

1) Target gene: G protein

50°C	30min	
95°C	15min	
94°C	15sec	45 cycles
55°C	60sec	
15°C	∞	

*참조논문: Isolation and Characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea (Kwon et al)

주 의

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