



가출질병대응기술사업 R & D Report

발간등록번호
11-1543000-002373-01

광견병미끼백신살포지역의 항체모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정기법 개발

최종보고서

2018.11.12.

주관연구기관 / (주)코젠바이오텍
협동연구기관 / 강원대학교
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정기법 개발” (개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 09. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10. 19.

주관연구기관명 : (주)코젠바이오텍 (대표자) 남용석 (인)

제1 협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단

제2 협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박봉균



주관연구책임자 : 남용석

제1 협동연구책임자 : 김종택

제2 협동연구책임자 : 양동균

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316095-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05 ~ 2018.09.04	단 계 구 분	(총 1 단 계)/ (총 1 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발			
연구책임자	남용석	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 367,000천원 민간: 122,400천원 계: 489,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 367,000천원 민간: 122,400천원 계: 489,400천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)코젠바이오텍, 강원대학교, 농림축산 검역본부			참여기업명 (주)코젠바이오텍	
국제공동연구	상대국명: 없음			상대국 연구기관명: 없음	
위탁연구	연구기관명: 없음			연구책임자: 없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의
보안등급 및
사유

일반 (세계 초일류 제품이거나 개발된 성과의 유출시 국가 및 기관에
심각한 피해가 우려되지 않는 사항임)

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 장비	기술 요약 정보	소 프 트 웨 어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물자원	정 보	실 물
등록·기탁 번호	P M I D : 2 8 7 7 5 9 7 5 , 3 0 1 1 2 3 4 7 , 22448528 (3건)	특 허 출 원 : 10-2018-0102213, 10-2018-0102226 (2건)							KVCC 기탁번호: BA1700031, BA1700032, BA1700033, BA1700034, BA1700035, BA1700036, BA1700037, BA1700038, BA1700039, BA1700040, BA1700041, BA1700042, BA1700043, BA1700044, BA1700045, BA1700046, BA1700047, BA1700048, BA1700049, BA1700050, BA1700051, BA1800442, BA1800443, BA1800444, BA1800445, BA1800446, BA1800447, BA1800448, BA1800449, BA1800450, BA1800451, BA1800452, BA1800453, BA1800454, BA1800455, BA1800456, BA1800457, BA1800458, BA1800459, BA1800460, BA1800461, BA1800462, BA1800463, BA1800464, BA1800465, BA1800466, BA1800467, BA1800468, BA1800469, BA1800470, BA1800471, BA1800472, BA1800473, BA1800474, BA1800475, BA1800476, BA1800477, BA1800478, BA1800479, BA1800480 (60건)		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

기술실시 (1건) 상품화 (6건) 고용창출 (1건) 정책건의 (2건) 특허출원 (2건) 논문 (3건) 학술대회 발표 (2건) 동물용 의료기기 허가(수출용) (6건) 생명자원 기탁 (60건)	보고서 면수 128 페이지
---	-----------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>연구의 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 경기도 및 강원도 서식 너구리의 포획 ○ 포획한 너구리에서 광견병 임상검사 및 광견병 항체 모니터링 ○ 광견병 미끼백신 또는 미끼백신 후보주와 감별되는 검사키트의 개발 및 산업화 <p>연구의 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 광견병 발생정보 분석 ○ 광견병을 전파시키는 너구리에서 광견병 임상검사 ○ 포획 너구리에서 광견병 혈청검사 및 분석 ○ 미끼백신과 야외 광견병 바이러스를 감별하는 검사기법 개발 ○ 현재 사용 중인 VRG, 미래에 사용가능한 재조합광견병 바이러스, 재조합아데노바이러스와 국내에서 발생한 광견병 바이러스와 감별 가능한 신속한 유전자 키트의 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미끼백신 살포지역에서 포획한 너구리의 광견병 항체검사를 통해서 미끼백신 살포정책의 뒷받침 및 향후 개선대책 수립 ○ 광견병 미끼 백신과 감별되는 검사키트의 산업화 ○ 광견병 조기감시체계 구축으로 광견병 청정국 지위 획득KCI급 3건, 정책제안 2건(광견병 미끼백신 살포 요령, 광견병 재발생시 광견병 방역대책) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 광견병 발생정보 분석에 대한 학술발표 ○ 광견병을 전파시키는 너구리의 임상검사 (100두/년 이상) 및 포획 너구리에서 광견병 혈청검사의 결과에 대한 학술발표 및 논문발표 <ul style="list-style-type: none"> - 광견병 혈청 모니터링 결과를 통한 미끼백신살포 방법 개선 ○ 미끼백신과 야외 광견병 바이러스를 감별하는 검사기법의 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 사용 중이거나 미래에 사용 가능한 미끼백신주를 감별하는 검사 기법 개발 (감별기법의 특이도 및 민감도 조사 및 미끼백신주와 야외 광견병 바이러스에 대한 적용 시험) - 주기적인 야생동물 감시를 통한 광견병 청정지역 지위 확보 - 광견병 검사기법의 국산화 및 개발된 검사기법의 수출을 통한 범국가적 광견병 근절에 기여 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>광견병</p>	<p>미끼백신</p>	<p>항체</p>	<p>혈청검사</p>	<p>유전자감별</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>rabies</p>	<p>bait vaccine</p>	<p>antibody</p>	<p>serum test</p>	<p>differentiation</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	129
4. 연구결과의 활용 계획 등	132
붙임. 참고 문헌	133

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 광견병을 전파시키는 너구리의 임상검사 (100두/년 이상)
- 포획 너구리에서 광견병 항체가 분석
- 미끼백신과 야외 광견병 바이러스를 감별하는 광견병 유전자 진단법 개발
 - 실시간 유전자 검사법 기반 광견병 유전자 진단법 3건 개발
 - 유전자 검사법 기반 광견병 유전자 진단법 3건 개발
 - 분석적 민감도: $10^2 \sim 10^1$ copies/ μ l
 - 분석적 특이도: 목표 대상에만 특이적으로 반응
 - 정밀도: CV value < 5 %

1-2. 연구개발의 필요성

- 국내연구개발의 필요성 및 중요성
 - 한국에 서식하는 너구리(*Nyctereutes procyonoides koreensis*)는 광견병 전파에 중요한 역할을 함. 1907년 개에서 처음으로 광견병이 발견된 이후, 2011년까지 다수의 지역에서 개, 소, 너구리, 고양이 등 다양한 동물에서 광견병이 발생함.¹⁾ 광견병 근절을 위한 국가정책을 지속적으로 시행한 결과 1960년부터 1984년까지 동물에서의 광견병 발생 건수는 꾸준히 감소하였으며, 1985년부터 1992년까지 8년 동안은 광견병이 발생하지 않았음. 하지만 1993년 강원도 지역에서 광견병에 감염된 너구리와 개의 접촉으로 너구리에서 개로 광견병이 전염되어 재발하는 등 이후 광견병 발생건수는 꾸준히 증가하고 있는 것으로 보고됨.²⁾
 - 국내에서는 광견병 근절을 위하여 2000년도부터 V-RG(Vaccinia-Rabies Glycoprotein) 미끼백신을 광견병 발생 위험지역에 살포하고 있음. 미끼백신 살포 이후 국내 광견병 발생건수는 대체적으로 감소하거나 발생하지 않고 있지만 강원도 지역은 광견병이 근절되지 않고 지속적으로 발생하고 있는 실정임.

○ 경제적 측면

- 광견병으로 인해 발생하는 경제적 손실은 국가에 따라 다양하게 나타나지만 아시아의 경우 매년 \$563,000,000, 아프리카의 경우 \$20,500,000, 유럽의 경우 1986년부터 1995년까지 \$261,000,000를 지출하는 것으로 확인됨.³⁾ 이를 모두 환산할 경우 전 세계적으로 연간 최소 10억 달러의 경제적 손실을 야기함. 광견병의 경우 인수공통 질환의 특징과 치명적인 사망률로 인해서 타 전염병에 비해서 공중보건학적 파급효과가 큰 것으로 알려져 있음. 특히, 광견병 이환에 의한 동물의 사망 및 경제적 피해액수보다 광견병 파급으로 인한 사회적 파급효과는 경제적으로 환산하기 어려운 많은 피해를 유발함. 이러한 광견병에 대한 주요 전파체 역할을 하는 너구리의 광견병 발생 위험 지역의 광견병 백신 사업을 강화함으로써 광견병의 발생율을 줄이

고 광견병 파급으로 인한 사회적 비용을 줄일 수 있음.

○ 사회적 측면

- 우리나라는 사람에서의 광견병 발생율은 매우 드문 편. 그러나 광견병의 인수공통 질환의 특징과 치명적 성향으로 인해서 광견병의 발생건수에 비해 사회적 파급효과는 매우 큼. 이러한 광견병의 주요 매개체가 되는 야생동물, 특히 너구리에 대한 광견병 위험 지역의 예방활동을 강화해야 함. 광견병의 경우 모든 온혈동물에 감염이 되기 때문에 광견병에 대한 예방대책을 강구하여 전파 확산을 차단하여 국민건강을 안전하게 도모하는데 일조할 수 있음.
- 광견병 미끼백신의 살포수량 및 그 비용, 미끼백신 살포에 대한 효능평가가 실시되지 않고 있어서 야생 너구리에 투여된 미끼백신과 광견병 바이러스의 구분 검출이 필요함.
- 주기적인 감시활동 및 효율적인 방제작업을 통한 광견병 청정국 지위 획득에 중요자료가 될 것이며 국내에서 광견병 재발생시 신속한 진단으로 광견병의 전파 확산을 방지에 사용이 가능함. 야외 광견병 바이러스와 미끼백신주와 감별되는 유전자 키트 개발로 국내 광견병 근절사업에 협조가 가능함.

1-3. 연구개발 범위

- 경기도 및 강원도에 서식하고 있는 너구리의 포획
 - 광견병을 전파시키는 너구리의 임상검사 및 임상축에 대한 정밀검사(100두/년 이상)
- 포획 너구리에서 광견병 항체가 분석
 - 경기도 및 강원도에서 포획한 너구리에서 채취한 혈청샘플에서 바이러스중화시험을 통해 광견병에 대한 항체가를 분석
- 유전자 증폭기법(PCR) 기반 광견병 바이러스 진단기법 개발
 - 기존 미끼백신주/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 백신후보(재조합 백신)/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 백신후보(아데노바이러스 백신)/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 정상적인 반응 및 저해요소 탐지를 위한 IC 첨가
- 실시간 유전자 증폭기법(PCR) 기반 광견병 바이러스 진단기법 개발
 - 기존 미끼백신주/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 백신후보(재조합 백신)/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 백신후보(아데노바이러스 백신)/광견병 동시 검출시스템 개발
 - 정상적인 반응 및 저해요소 탐지를 위한 IC 첨가

○ 광견병 바이러스 진단법

- 유전자증폭기법 및 실시간유전자증폭기법을 이용한 광견병 바이러스 진단법 모두 현재 사용중인 미끼백신과 광견병 바이러스를 구별하는 진단법 그리고 추후 사용될 가능성이 있는 백신 2종과 광견병 바이러스를 구별하는 것을 목적으로 함.

○ 광견병 미끼백신의 살포 요령 개선

- 현재 광견병 미끼백신은 살포하기전에 교육을 실시하고, 살포지역 및 살포방법을 숙지한 후 사람에 의해 살포하고 있음. 이러한 미끼백신의 살포방법을 개선하기위한 방법을 모색하고 헬기를 이용한 미끼백신의 살포방법을 제안

○ 광견병 방역강화대책 수립

- 단기 광견병 방역대책: 광견병발생지역에 미끼백신의 집중살포, 위험지역내 사육가축의 백신 100% 접종, 유기동물의 포획 및 백신접종
- 장기 광견병 방역대책: DMZ내 광견병 근절의 효과증대를 위한 북한지역 DMZ에 대한 미끼예방약 살포사업 제안
- 포획-백신-방사(Trap-Vaccine-Release) 프로그램 보급방안 적용

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 주관기관: (주)코젠바이오텍

1차년도 연구성과

가. 실시간 유전자증폭기법을 기반으로한 광견병 유전자 진단법 개발

1) 광견병 유전자 진단법 개발 계획수립 및 관련 자료조사

광견병 유전자 진단법 관련 문헌조사를 통해 19종의 논문에서 기존에 알려진 24가지의 광견병 바이러스 유전자 진단용 프라이머, 프로브 염기서열을 확보. (표 1)

표 1. 문헌조사를 통해 확보한 광견병 바이러스 유전자 진단용 프라이머, 프로브 염기서열

No.	Name	Primer / probe	Sequence	Reference
1	20R	R	AGCTTGGCTGCATTCATGCC	Shankar V, Bowen RA, Davis AD, Rupprecht CE, O'Shea TJ (2004) Rabies in a captive colony of big brown bats (<i>Eptesicus fuscus</i>). <i>J Wildl Dis</i> 40: 403-413.
	21F	F	ATGTAACACCCCTACAATG	
	23F	F	CAATATGAGTACAAGTACCCGGC	
2	RabN1	F	GCTCTAGAACCCTCTCAATGGATGCCGACAA	Nadin-Davis SA (1998) Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. <i>J Virol Methods</i> 75: 1-8.
	RabN5	R	GGATTGAC(AG)AAGATCTTGCTCAT	
	RabNF	F	TTGT(AG)GAT(C)CAATATGAGTACAA	
	RabNR	R	CCGGCTCAAACTTCTTCTTA	
3	P510	F	ATA GAG CAG ATTTTC GAG ACA GC	Soares RM, Bernardi F, Sakamoto SM, Heinemann MB, Cortez A, Alves LM, Meyer AD, Ro FH, Richtzenhain LJ (2002) A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 97: 109-111.
	P942	R	CCC ATA TAA CAT CCA ACA AAG TG	
	P784	R	CCT CAA AGT TCT TGT GGAAGA	
4	N1161	F	AAG AAC TTC AAG AAT ACG AGG C	East ML, Hofer H, Cox JH, Wylie U, Wink H, Ritra C (2001) Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 98: 15028-15031.
	N1579	R	TTC AGC CAT CTC AAG ATC GG	
5	113	F	GTAGGATGATATATGGG	David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dvornik N, Davidson I, Stram Y (2002) Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. <i>Vet Microbiol</i> 87: 111-118.
	509	F	GAGAAAGAAGTCAAGA	
	304	R	GAGTCACTCGAATATGTC	
6		F	ACT GAT GTA GAA GGGAAAT TG	Gupta RK, Singh RK, Sharma RN, Rao Yu, Butchiah G (2001) Preliminary report on a single-tube, non-nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of rabies virus in brain tissue. <i>Vet Res Commun</i> 25: 235-247.
		R	GAA CGG AAG TGG ATG AAA TA	
		F	TAA TCC CAG AGA TGC AAT	
		R	CCT CAC AGT CTG GTC TCACC	
7	Primer 1	F	GAAGCTGAGATTATCGTGG	Kulonen K, Fakadu M, Whitfield S, Warner CK (1999) An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carboxy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. <i>Zentralbl Veterinarmed B</i> 46: 151-155.
	Primer 2	R	CCCTTCTACATCAGTACG	
	Primer 3	F	TGAGTACAAGTACCTCTGC	
	Primer 4	R	GGAACTATACATCGTCAAG	
8	N1	F	TAGGGAGAAGGATCGTGGAGCACCATACTCTCA	Wecharapluadee S, Sutpanya J, Damrongwatanapokin S, Phumasin P, Chamnanpood P, Laowjuk C, Hemachudha T (2008) Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. <i>J Virol Methods</i> 151: 317-320.
	N2	R	GATGCAAGGTCCG ATATGAGTACCAG CCCTGAACAGTCTCTCA	
9	N12	F	GTAACACCTCTACAATGG	Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gascin A, Caro F, Bourhy H (1998) Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. <i>J Clin Microbiol</i> 36: 1117-1121.
	N40	R	GCTTGATGATTGGAACCTG	
10	N1	F	TTT GAG ACT GCT CCT TTT	Whitby JE, Johnston P, Sillem-Dubiri C (1997) Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. <i>J Wildl Dis</i> 33: 912-915.
	N40	R	GCT TGA TGA TTG GAA CT	
	JW4	F	AGAATGTTTGAGCCACGGGA	
	JW5	R	TCAGGTGAAACCAAGGATCC	
11	N1	F	TTT GAG ACT GCT CCT TTT	Sacramento D, Bourhy H, Tordo N (1991) PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. <i>Mol Cell Probes</i> 5: 229-240.
	N2	R	CC CAT ATA GCA TCC TAC	
12	LISEBL1F	F	AAGATGTGTGCCAATCGGAG	Echevarria JE, Avellon A, Juste J, Vera M, Ibanez C (2001) Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Populations by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. <i>J Clin Microbiol</i> 39: 3676-3683.
	LISEBL1R	R	ATGTTTGAGCCAGGGCAAGA	
	LISEBL2F	F	TACTGCTTATGAGGATGTTTC	
	LISEBL2R	R	AAGAACTTCGAGGAAGAGATC	
13	GRAB1F	F	AARATNGTRGARCYACACAC	Vazquez-Moron S, Avellon A, Echevarria JE (2006) RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. <i>J Virol Methods</i> 135: 29-287.
	GRAB1R	R	GCRTTSGANGARTAAAGGAGA	
	GRAB2F	F	AARATGTGYCIAAYTGGAG	
	GRAB2R	R	TCYTHCCIGGCTRAACAT	
14	JW12	F	ATGTAACACCYCTACAATG	Wakelley PR, Johnson N, McBlinnay LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR (2005) Development of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. <i>J Clin Microbiol</i> 43: 2786-2792.
	N165-146	R	GCAGGGTAYTTRTACTCATA	
	LysGT1	P	ACAGATTTGATTCAAGTCAATAATCAG	
15	Probe	P	AAGCCCATGATAACCTTAGGAAA	Shankar V, Bowen RA, Davis AD, Rupprecht CE, O'Shea TJ (2004) Rabies in a captive colony of big brown bats (<i>Eptesicus fuscus</i>). <i>J Wildl Dis</i> 40: 403-413.
	23F	F	CAATATGAGTACAAGTACCCGGC	
16	20R	R	AGCTTGGCTGCATTCATGCC	Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamal A, Madhusudana SN, Rav V (2006) A simple diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. <i>J Clin Virol</i> 36: 17-23.
	O1	F	CTACAATGGATGCCGAC	
	R6	R	CCTAGAGTTATACAGGGCT	
17	RB probe	P	TCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGG	Wecharapluadee S, Sutpanya J, Damrongwatanapokin S, Phumasin P, Chamnanpood P, Laowjuk C, Hemachudha T (2008) Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. <i>J Virol Methods</i> 151: 317-320.
	1129F	F	CTGGCAGACGACGGAAACC	
	1218R	R	CATGATTCGATATAGACAGCC	
18	gt1L	F	TACAATGGATGCCGACAAGA	Orłowska A, Smreczek M, Trebas P, Zmudzinski JF (2008) Comparison of real-time PCR and heminested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. <i>Bull Vet Inst Pulawy</i> 52: 313-318.
	gt1P	R	CAAATC TTGATGGCAGGGTA	
	AWgt1	P	TCAGGTGTCTCTTTGAAGCCTGAGA	
19		F	GAATCCTGATAGCACGGAGGG	
	AZ-EF	R	CTTCCACATCGGTGCGTTTT	
		P	CAAGATCACCCCAAATCTCTTTGTGGACA	
20		F	GTCGGCTGCTATATGGGTGAG	
	AZ-SK	R	ATCTCATGGGAGCACAGG	
		P	TGAGGTCCTTGAATGCAACGGTAATAGCC	
21		F	TCATGATGAATGGAGGTCGACTC	
	CA-SK	R	TTGATGATTGGAAGTACTGAGACA	
22		P	AGAGATCGCATATACGGAGAT	
	NC SK	F	GGTGAACCGAAGTCCGGAA	
		R	CCGTATATGCGATCTCTTTAGTCGA	
23		P	CTGTCTACTCGAATCATGA	
	RAC	F	TGTTGAAACCGAGGATCCAGA	
		R	ATCTTTTGTGAGTCGGCCCC	
24		P	CGGTCTACTCGGATCAT	
	SCSK	F	ATGATGAAGACTATTTCTCGGTGAG	
		R	GTCGGCCCTCAATCATCATG	
	P	CGGAGGCAGCTATATC		

또한, 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 프라이머, 프로브 제작을 위해 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등재되어 있는 한국형 광견병 바이러스의 N gene 염기서열 47종을 확보함. (표 2)

표 2. 문헌조사를 통해 확보한 한국형 광견병 바이러스 염기서열

#	Name	Description	Sequence Length (bp)
1	AB781935	Rabies virus viral cRNA, complete genome, strain: ERA	11932
2	AY730595	Rabies virus isolate KRH2-04 nucleocapsid gene, complete cds	1353
3	AY730596	Rabies virus isolate KRH3-04 nucleocapsid gene, complete cds	1353
4	AY730597	Rabies virus isolate KRC5-04 nucleocapsid gene, complete cds	1353
5	DQ076119	Rabies virus isolate SKRBV9801YC nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
6	DQ076120	Rabies virus isolate SKRDG9902GY nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
7	DQ076121	Rabies virus isolate SKRRD9902PJ nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
8	DQ076122	Rabies virus isolate SKRDG9901GY nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
9	DQ076123	Rabies virus isolate SKRRD9901PJ nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
10	DQ076124	Rabies virus isolate SKRDG0203CW nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
11	DQ076125	Rabies virus isolate SKRDG0204CW nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
12	DQ076126	Rabies virus isolate SKRRD0406CC nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
13	DQ076127	Rabies virus isolate SKRRD0205HC nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
14	DQ076128	Rabies virus isolate SKRRD0204HC nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
15	DQ076129	Rabies virus isolate SKRBV0403CW nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
16	DQ076130	Rabies virus isolate SKRBV0404HC nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
17	DQ076131	Rabies virus isolate SKRRD9903YG nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
18	GU937035	Rabies virus isolate KRVR0906 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
19	GU937036	Rabies virus isolate KRVR0901 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
20	GU937037	Rabies virus isolate KRVR0804 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
21	GU937038	Rabies virus isolate KRVR0803 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
22	GU937039	Rabies virus isolate KRVR0801 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
23	GU937040	Rabies virus isolate KRV0802 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
24	GU937041	Rabies virus isolate KRVB0907 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
25	GU937042	Rabies virus isolate KRVB0905 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
26	GU937043	Rabies virus isolate KRVB0904 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
27	GU937044	Rabies virus isolate KRVB0903 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
28	GU937045	Rabies virus isolate KRVB0902 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
29	KC171643	Rabies virus isolate 08F40, complete genome	11928
30	KC171644	Rabies virus isolate BD0406CC, complete genome	11928
31	KC171645	Rabies virus isolate BV9901PJ, complete genome	11928
32	KF709083	Rabies virus isolate KRVC1007 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
33	KF709084	Rabies virus isolate KRVB1008 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
34	KF709085	Rabies virus isolate KRVB1101 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
35	KF709086	Rabies virus isolate KRVB1102 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
36	KF709087	Rabies virus isolate KRVB1103 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
37	KF709088	Rabies virus isolate KRVB1104 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
38	KF709089	Rabies virus isolate KRVR1202 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
39	KF709090	Rabies virus isolate KRVB1206 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
40	KF709091	Rabies virus isolate KRVR1207 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
41	KF709092	Rabies virus isolate KRVF1301 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
42	KF709093	Rabies virus isolate KRVB1302 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
43	KF709094	Rabies virus isolate KRVC1303 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
44	KF709095	Rabies virus isolate KRVC1304 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
45	KF709096	Rabies virus isolate KRVC1305 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
46	KJ476821	Rabies virus isolate KRVB0910 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353
47	KJ476822	Rabies virus isolate KRVR1201 nucleoprotein (N) gene, complete cds	1353

- 2) 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 프라이머, 프로브 제작
 가) 실시간 유전자 증폭기법을 이용한 야생형 광견병 바이러스 진단용 프라이머, 프로브 개발

문헌조사를 통해 확보한 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용하여 야생형 광견병 바이러스 진단용 실시간 유전자 증폭기법 프라이머, 프로브 제작함. 제작된 야생형 광견병 바이러스 진단용 실시간 유전자 증폭기법 프라이머, 프로브는 문헌조사를 통해 확보한 광견병 바이러스 유전자 진단용 프라이머, 프로브 염기서열과 비교하여 이론적인 검출가능성을 확인하였고 그 결과, 문헌조사를 통해 확보한 기존 광견병 바이러스 유전자 진단용 프라이머, 프로브와 달리 47개의 한국형 광견병 바이러스 염기서열에 완벽하게 일치하는 것을 확인하였음. (그림 1~4)

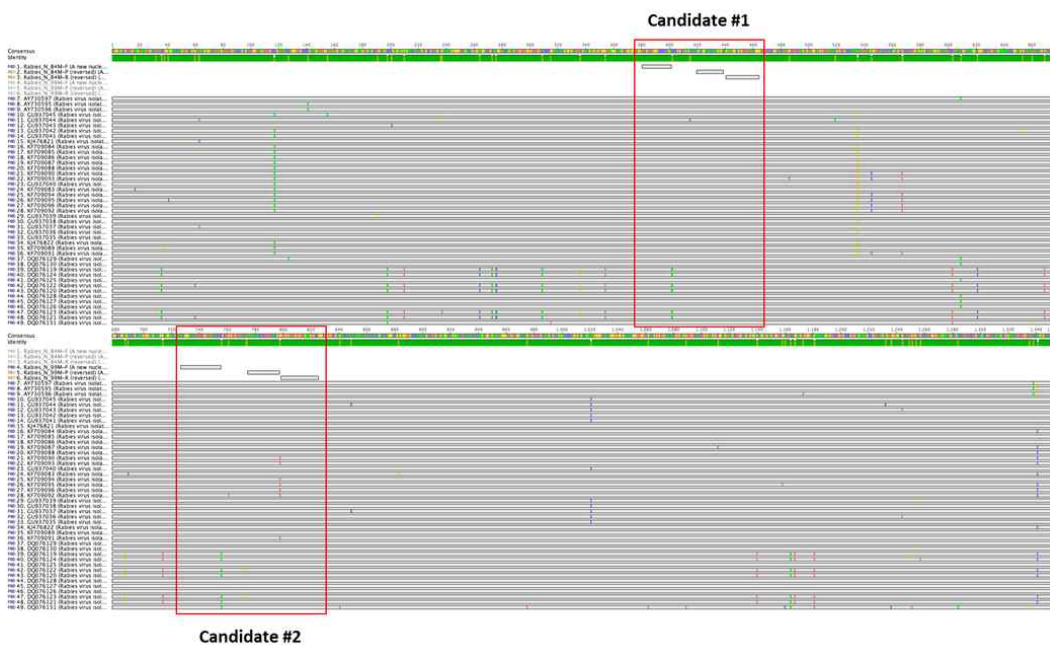


그림 1. 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용한 야생형 광견병 바이러스 진단용 실시간 유전자증폭기법 프라이머, 프로브 후보 제작

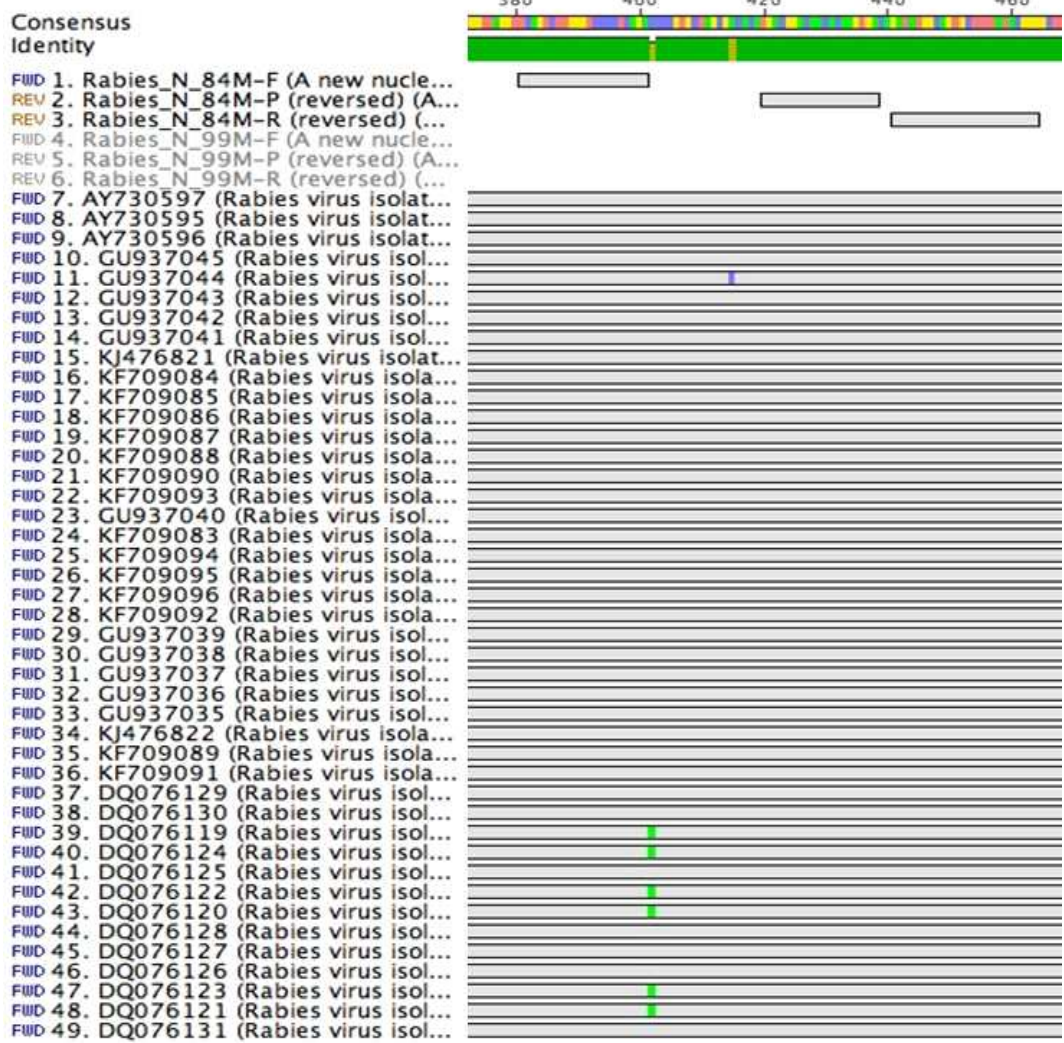


그림 2. 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용한 야생형 광견병 바이러스 진단용 실시간 유전자증폭기법 프라이머, 프로브 후보 1

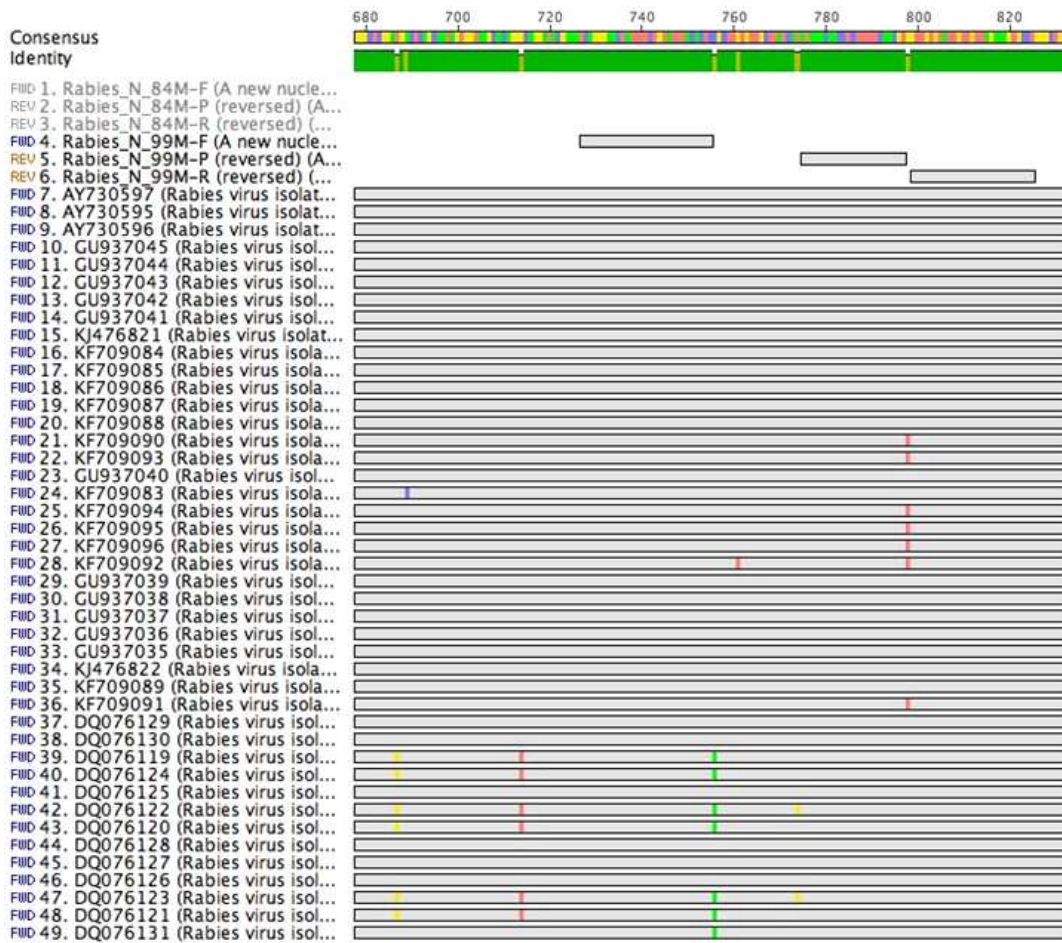


그림 3. 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용한 야생형 광견병 바이러스 진단용 실시간 유전자증폭기법 프라이머, 프로브 후보 2

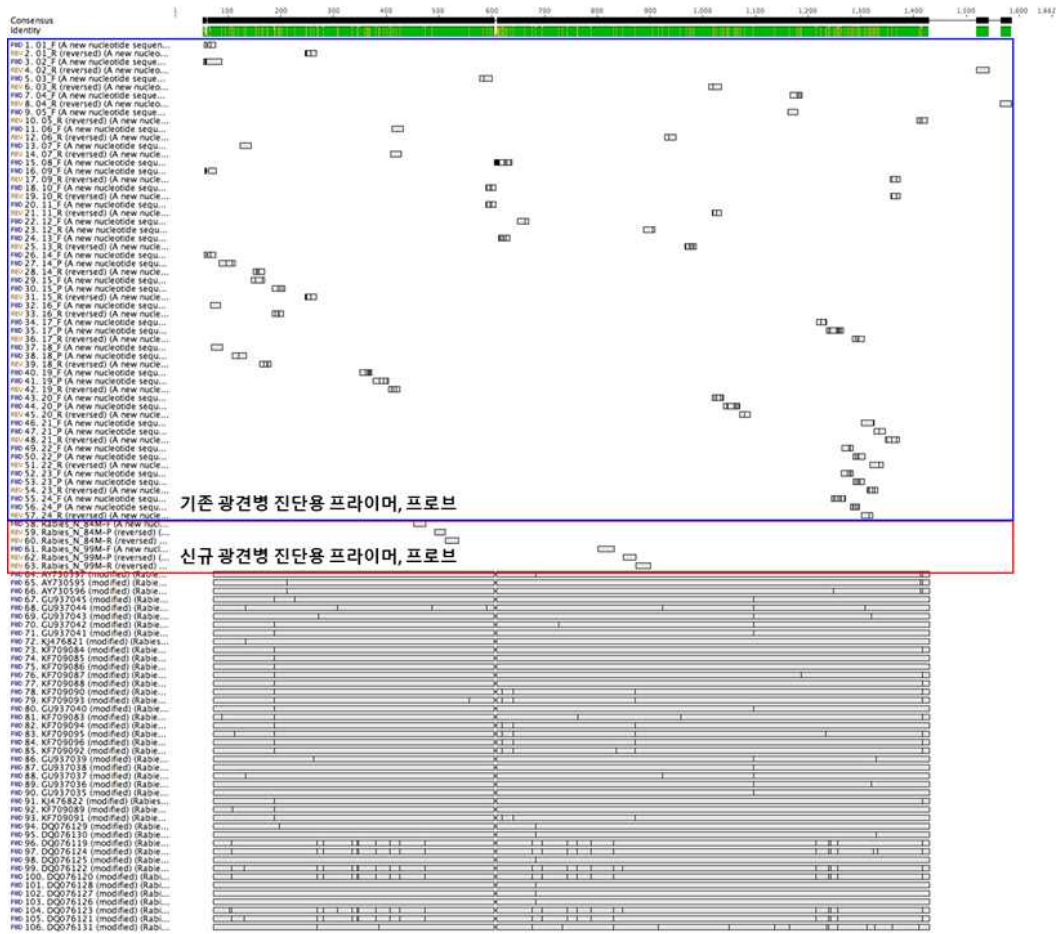


그림 4. 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용한 기존 광견병 진단용 프라이머, 프로브와 신규 광견병 진단용 프라이머, 프로브의 이론적 적합성 평가 (박스 내 수직선이 적을수록 광견병 바이러스 검출에 적합함)

나) 실시간 유전자 증폭기법을 이용한 ERAGS 백신주 진단용 프라이머, 프로브 개발 문헌조사를 통해 확보된 ERAGS 백신주 염기서열과 야생형 광견병 바이러스 염기서열을 비교 분석하여 ERAGS 백신주에서만 특이적으로 증폭될 수 있는 실시간 유전자 증폭기법용 프라이머, 프로브를 제작함. (그림 5~6)

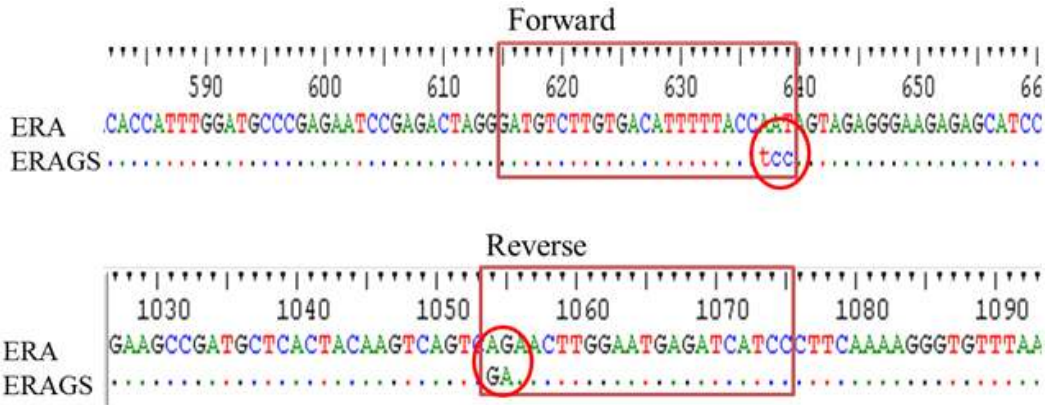


그림 5. 야생형광견병 바이러스(ERA strain)와 광견병 바이러스 백신주(ERAGS strain)간의 염기서열 차이

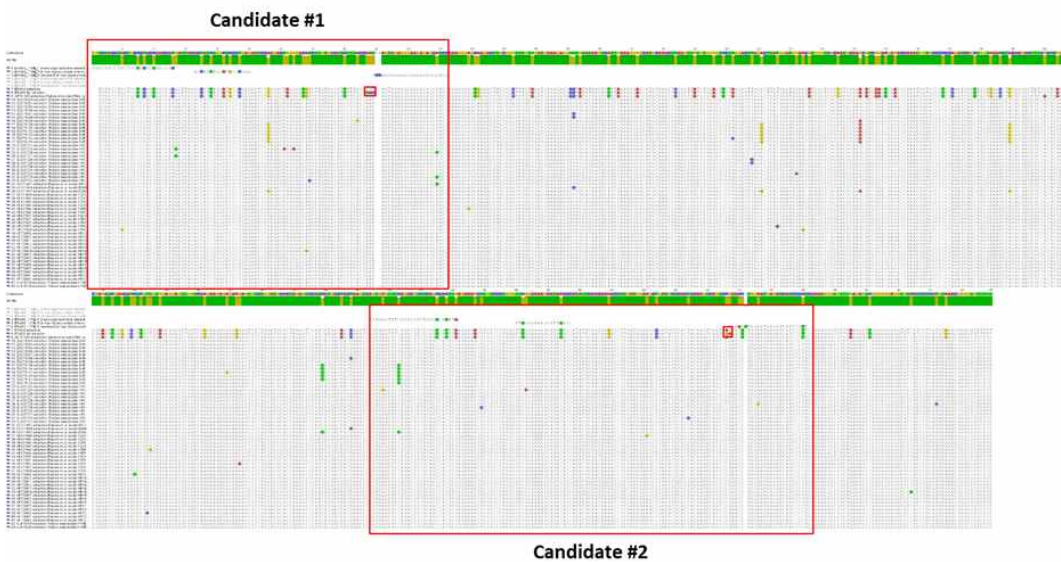


그림 6. 야생형광견병 바이러스(ERA strain) 염기서열과 한국형 광견병 바이러스 염기서열 그리고 광견병 바이러스 백신주(ERAGS strain) 염기서열을 이용한 ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭기법용 프라이머, 프로브 후보

다) 실시간 유전자 증폭기법을 이용한 Ad0910_G 백신주 진단용 프라이머, 프로브 개발 문헌조사를 통해 확보된 Ad0910_G 백신주 염기서열을 비교 분석하여 Ad910_G 백신주에서만 특이적으로 존재하는 아데노바이러스와 광견병바이러스 시퀀스 연결부위를 증폭할 수 있는 실시간 유전자 증폭기법용 프라이머, 프로브를 제작함. (그림 7)

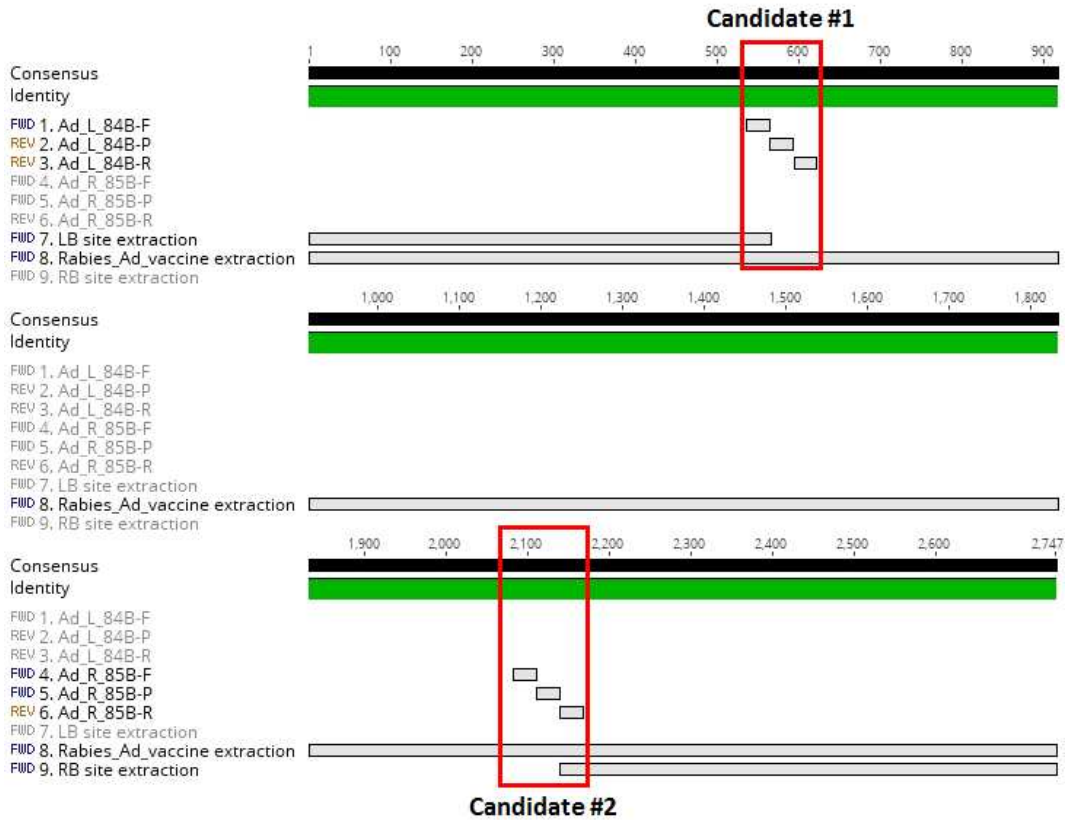


그림 7. Ad0910_G 백신주 염기서열을 이용한 Ad0910_G 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보

라) 실시간 유전자 증폭기법을 이용한 VRG 백신주 진단용 프라이머, 프로브 개발
 문헌조사를 통해 확보한 VRG 백신주 구조로 VRG 백신의 염기서열을 확보한 후 해당 염기서열을 이용하여 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보를 제작함. (그림 8)

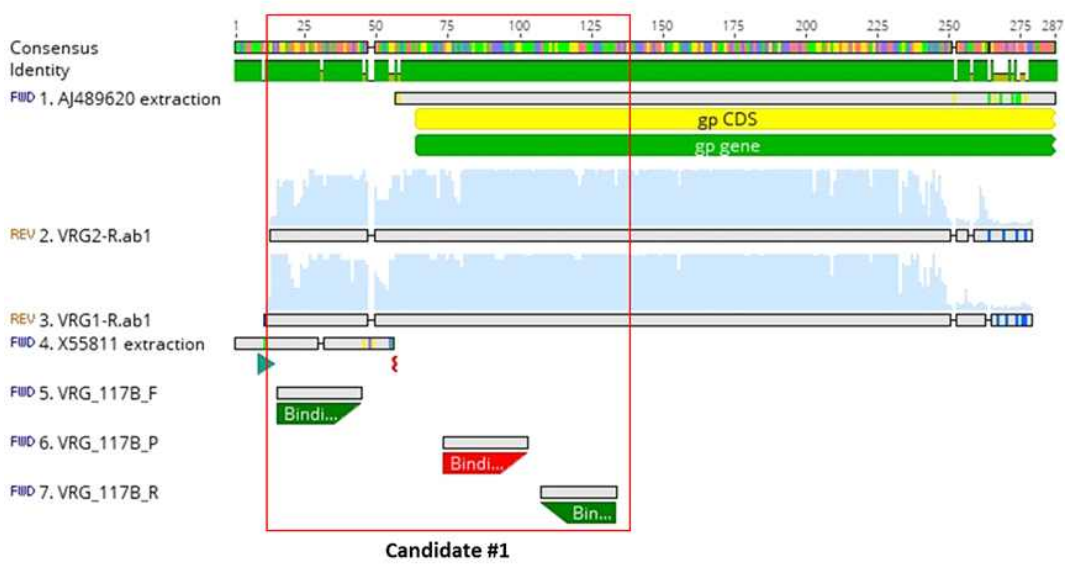


그림 8. VRG 백신주 염기서열을 이용한 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보

3) 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 관련 타겟에 대한 싱글시스템 제작
 가) 야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작

야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭 진단 싱글시스템은 야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 제작되었고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 야생형 광견병 바이러스의 돌연변이 백신주인 ERAGS gRNA를 사용함. 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 관련 타겟에 대한 싱글시스템 제작에는 모두 동일한 양의 프라이머, 프로브, Premix를 사용하였고 동일한 반응조성으로 실험함. (표 3~5) 야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭 진단 싱글시스템 시험결과 두 가지 야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보 모두 정상적으로 증폭되는 것을 확인함. (그림 9)

표 3. 싱글시스템 제작 시 사용된 프라이머, 프로브 농도

Target	Final concentration (nM)		
	Forward primer	Reverse primer	Probe
Candidate 1	500	500	100
Candidate 2	500	500	100

표 4. 싱글시스템 제작시 사용된 반응액 조성

Component	Volume (μℓ)
25x Enzyme mix	0.8
2x Reaction buffer	10.0
Primer/probe mix	1.0
D.W.	3.2
Template	5.0
Total	20.0

표 5. 싱글시스템 제작 시 사용된 실시간 유전자 증폭장치 반응조건

Temperature (°C)	Time	Repeat
50	30 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

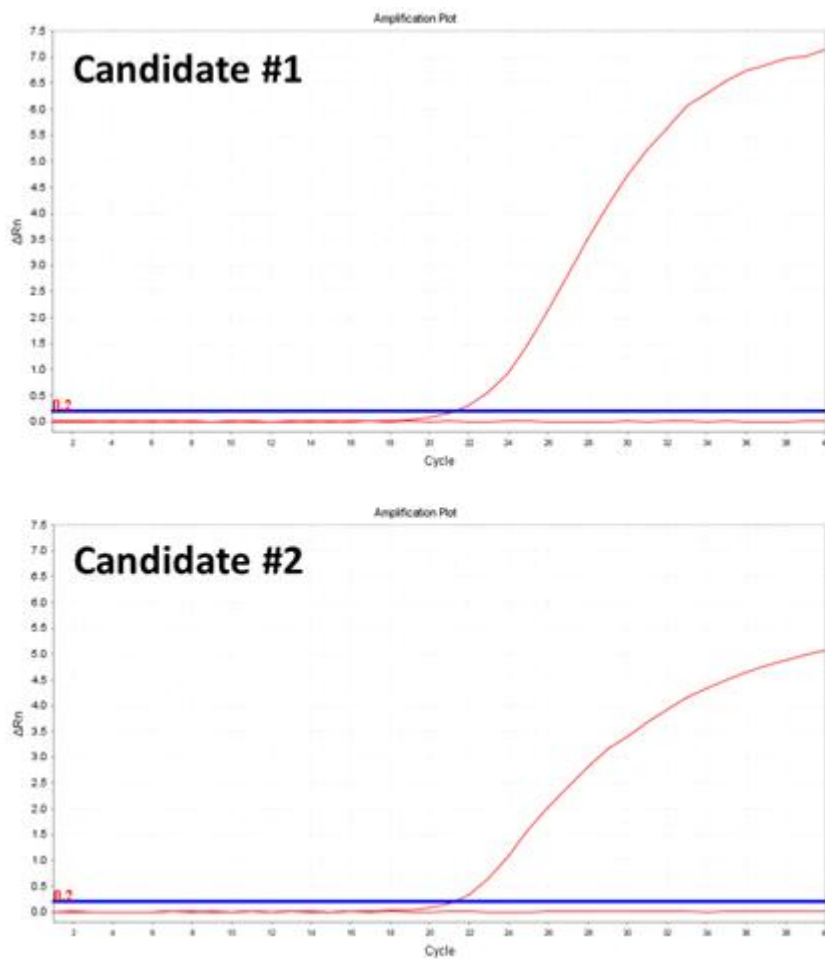


그림 9. 실시간 유전자 증폭기법 기반 야생형 광견병 바이러스 진단 싱글시스템 제작

나) ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작

ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 야생형 광견병 바이러스의 돌연변이 백신주인 ERAGS gRNA를 사용함. 시험결과 두 가지 ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보 중 후보 2는 비특이적 증폭이 확인되었고 후보 1에서만 ERAGS 백신주 특이적으로 증폭되는 것을 확인함. (그림 10)

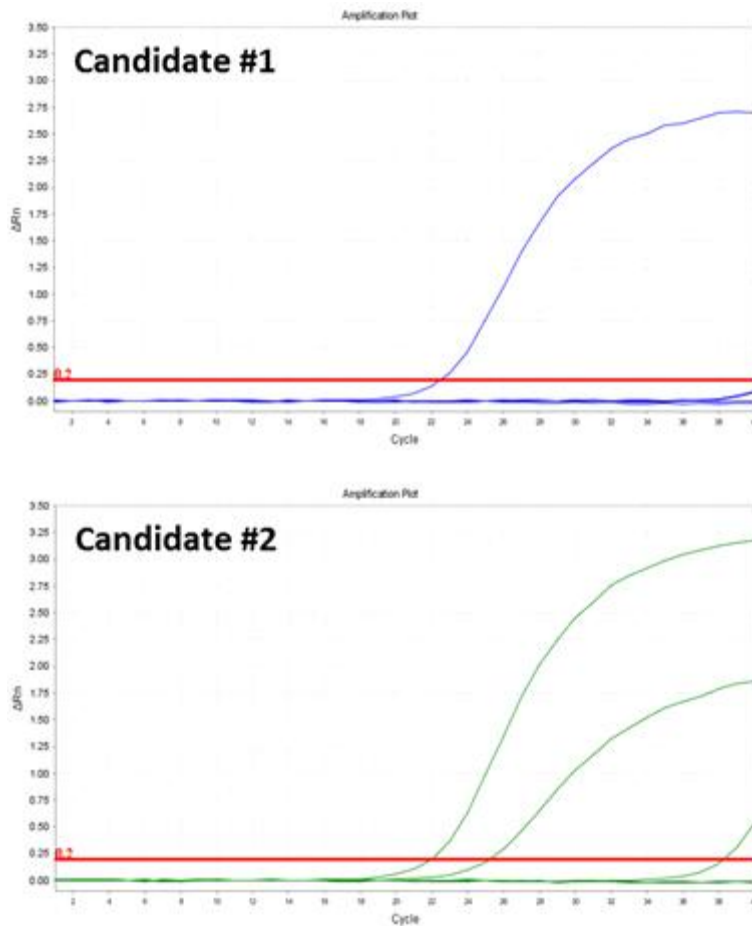


그림 10. 실시간 유전자 증폭기법 기반 ERAGS 백신주 진단 싱글시스템 제작

다) Ad0910_G 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작

Ad0910_G 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 Ad0910_G 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 Ad0910_G 백신주 gRNA를 사용함. 시험결과 두 가지 Ad0910_G 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보 중 후보 모두 Ad0910_G 백신주 특이적으로 증폭되는 것을 확인함. (그림 11)

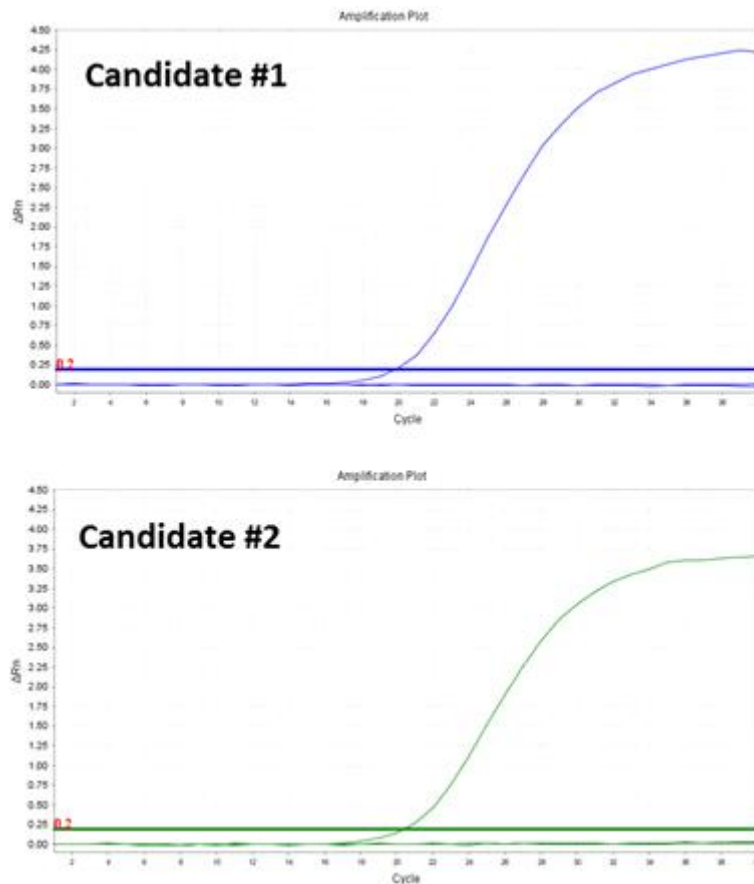


그림 11. 실시간 유전자 증폭기법 기반 Ad0910_G 백신주 진단 싱글시스템 제작

라) VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작

VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 VRG 백신주 gRNA를 사용함. (표 12~14) 시험결과 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보가 VRG 백신주 특이적으로 증폭되는 것을 확인함. (그림 12)

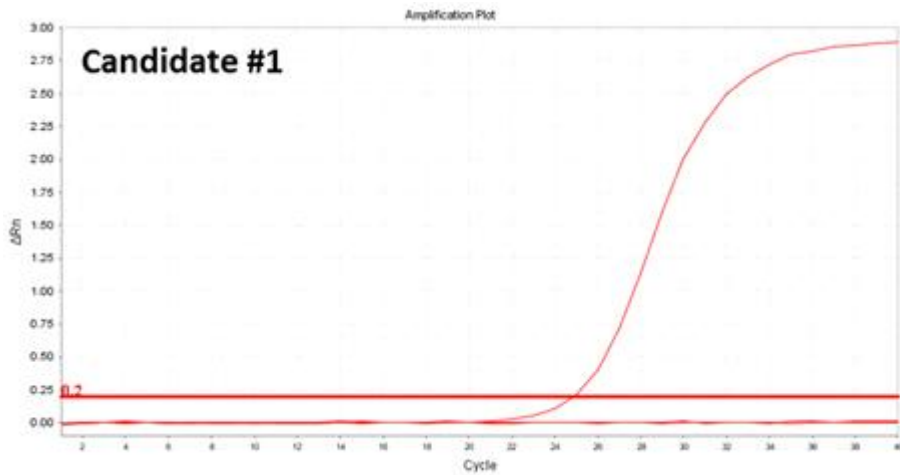


그림 12. 실시간 유전자 증폭기법 기반 VRG 백신주 진단 싱글시스템 제작

4) Multiplex inhibition test를 통한 조합선정

가) 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 진단 시스템 후보 1, 2를 ERAGS 백신주 후보 1과 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용된 모든 프라이머, 프로브 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함 시험결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수한 야생형 광견병 바이러스 진단 시스템 후보 1과 ERAGS 백신주 진단 시스템 후보 1의 조합을 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로 선정. (그림 13)

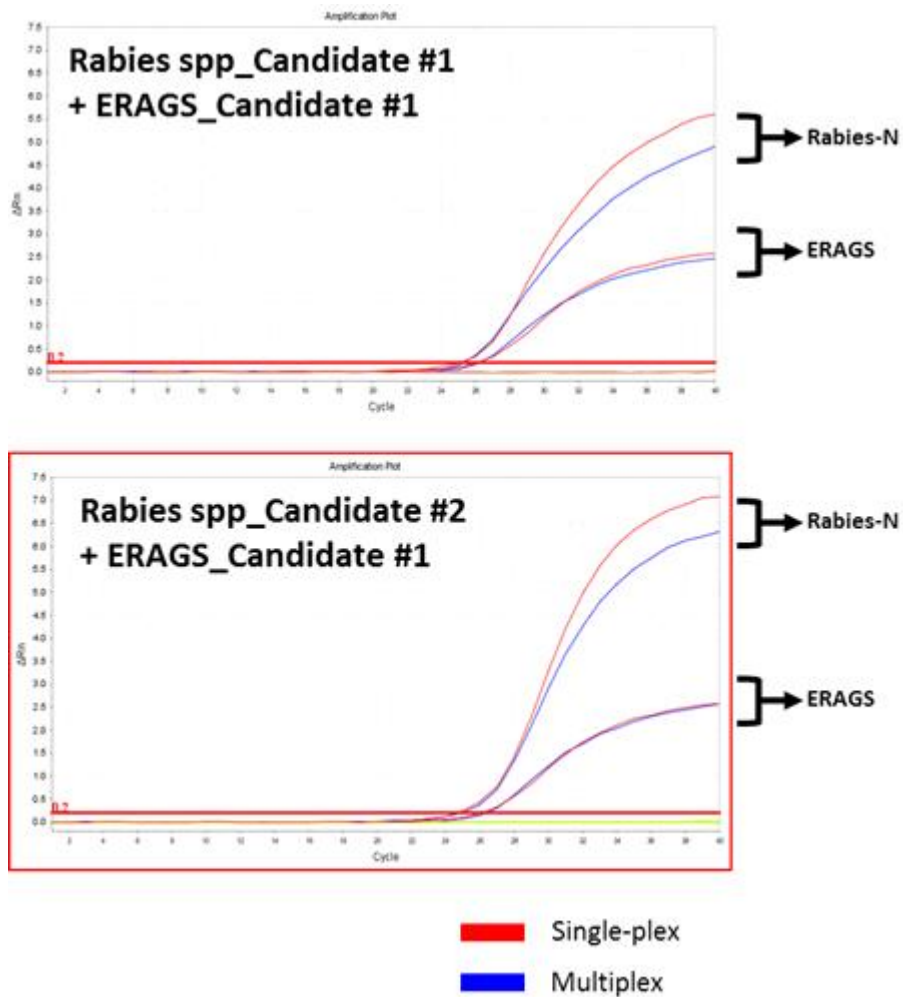


그림 13. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

나) 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test
 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를
 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 진단 시스템 후보 1, 2
 와 Ad0910_G 백신주 후보 1, 2를 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용된
 모든 프라이머, 프로브 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함.
 시험결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수한 야생형 광
 견병 바이러스 진단 시스템 후보 2와 Ad0910_G 백신주 진단 시스템 후보 1의 조합
 을 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로
 선정. (그림 14)

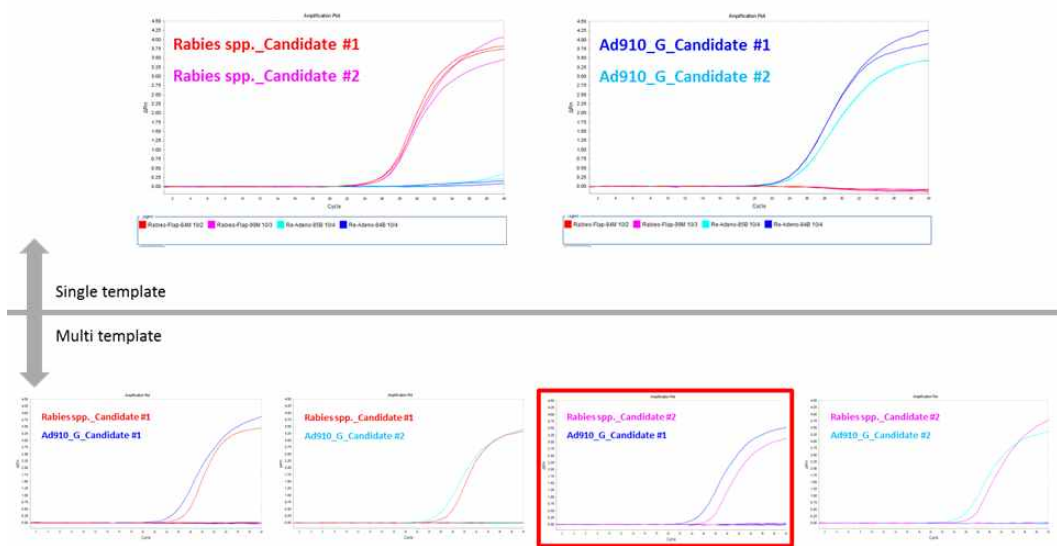


그림 14. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

다) 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 진단 시스템 후보 1, 2와 VRG 백신주 후보 1을 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용된 모든 프라이머, 프로브 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함. 시험결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수한 야생형 광견병 바이러스 진단 시스템 후보 2와 VRG 백신주 진단 시스템 후보 1의 조합을 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로 선정. (그림 15)

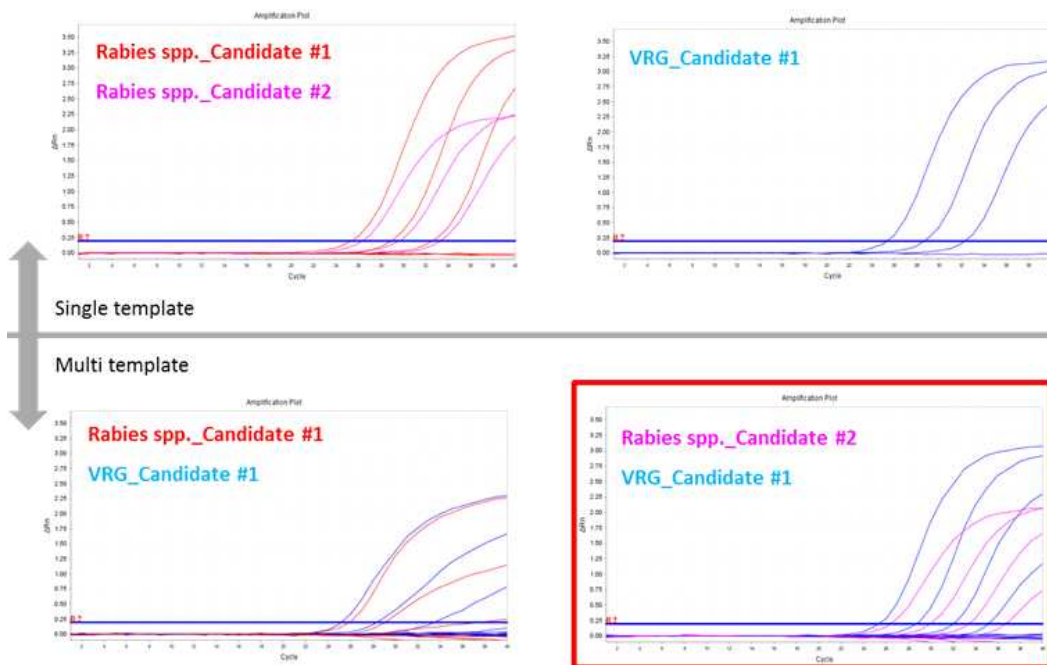


그림 15. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

5) Multiplex 최적화

가) 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 최적화

야생형 광견병 바이러스 프로브의 농도를 100 nM에서 150 nM로, ERAGS probe의 농도를 100 nM에서 300 nM로 변경하였을 때 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템의 증폭효율이 최적화됨을 확인함. (그림 16)

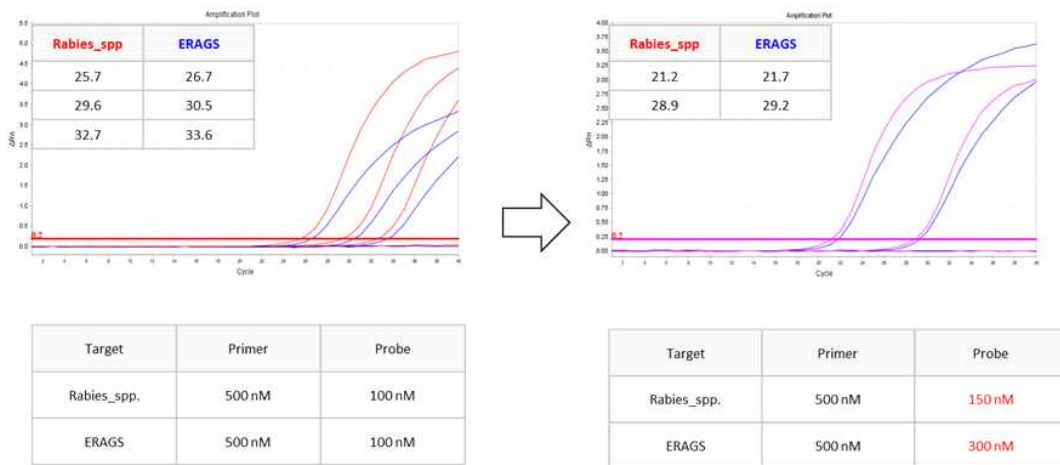


그림 16. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex 최적화

나) 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템의 최적화

야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머의 농도를 기존 500 nM에서 250 nM로 변경하고 Ad0910_G 백신주 특이적 프로브의 농도를 기존 100 nM에서 150nM로 변경하였을 때 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템의 증폭효율이 최적화됨을 확인함. (그림 17)

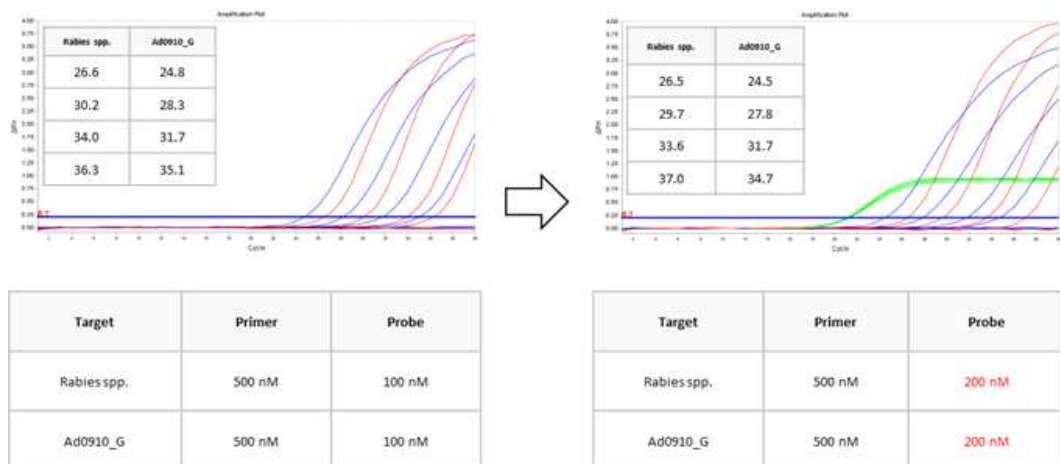


그림 17. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex 최적화

다) 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템의 최적화

야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머의 농도를 기존 500 nM에서 250 nM로, 프로브 농도를 100 nM에서 150 nM로 변경하고 VRG 백신주 특이적 프로브의 농도를 기존 100 nM에서 200 nM로 변경하였을 때 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템의 증폭효율이 최적화됨을 확인함. (그림 18)

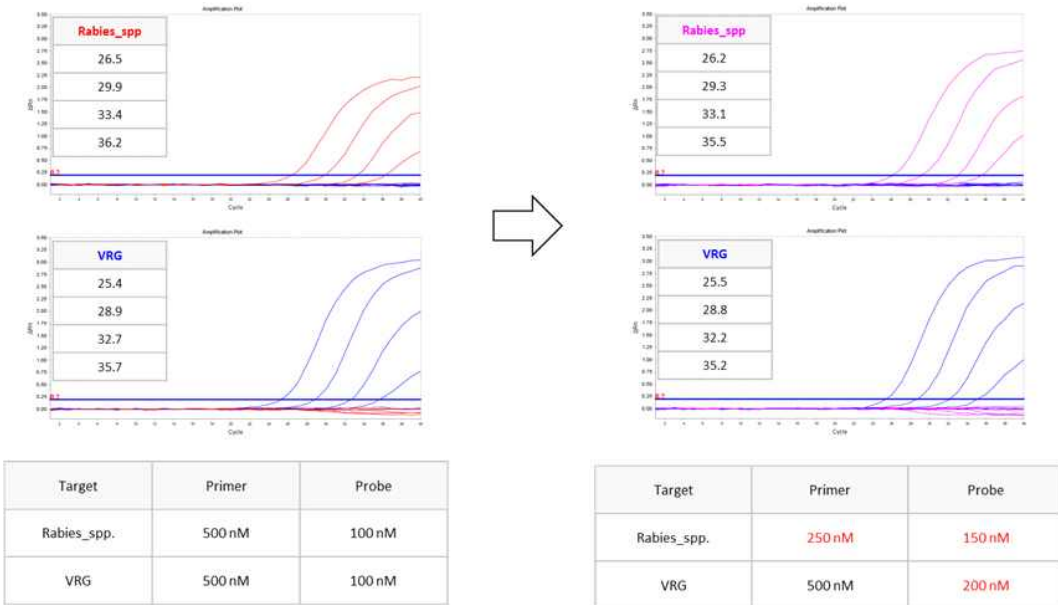


그림 18. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex 최적화

최종적으로 확정된 프라이머, 프로브의 염기서열 정보 및 사용량은 표 6과 같다.

표 6. 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 프라이머, 프로브 정보

조성물	타겟	타입	5'-염기	염기서열	3'-엔더	농도(nM)
Rabies/VRG qPCR multiplex	RABV	Forward primer	-	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	-	250
		Reverse primer	-	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC	-	250
		Probe	FAM	CAA GAA GAA CAT GAG GAA CTT TTG CAT CAA CG	BHO1	150
	VRG	Forward primer	-	CGG TAA GGA AGT AGA ATC ATA AAG AAC AGT	-	500
		Reverse primer	-	TAA ATA GGG AAT TTC CCA AAA CAC AAT	-	500
		Probe	JOE	AGG CTC TCC TGT TTG TAC CCC TTC TGG TTT	BHO1	200
Rabies/ERAGS qPCR multiplex	RABV	Forward primer	-	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	-	500
		Reverse primer	-	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC	-	500
		Probe	FAM	CAA GAA GAA CAT GAG GAA CTT TTG CAT CAA CG	BHO1	150
	ERAGS	Forward primer	-	GGT CTA CCT ACT GCT CCA CTA ACC AC	-	500
		Reverse primer	-	GGA TGC TCT CTT CCC TCT ACT GGA	-	500
		Probe	JOE	ATT ACA CCA TTT GGA TGC CCG AGA ATC	BHO1	300
Rabies/Ad0910_G qPCR multiplex	RABV	Forward primer	-	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	-	500
		Reverse primer	-	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC	-	500
		Probe	FAM	CAA GAA GAA CAT GAG GAA CTT TTG CAT CAA CG	BHO1	200
	Ad-0910G	Forward primer	-	AAA AGC GGA GGT GAG ACC AGA CT	-	500
		Reverse primer	-	GTT AGG GAT AGG CTT ACC TTC GAA CC	-	500
		Probe	JOE	CTT GTA CAA AGT GGT TGA TCT AGA GGG CCC G	BHO1	200

6) 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 성능평가

실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 성능을 평가하기 위해 분석적 성능평가와 임상적 성능평가를 수행함. 분석적 성능평가를 통해 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 민감도, 특이도 그리고 정밀도를 확인하였고 임상적 성능평가를 통해 실제 임상시료에서의 적용 가능성을 확인함.

가) 분석적 성능평가: 민감도

민감도 평가는 농림축산검역본부에서 분양받은 각 백신주별 양성시료를 이용한 in vitro transcript 또는 plasmid DNA를 10^6 copies/ μ l ~ 100 copies/ μ l 까지 10배씩 serial dilution 하여 사용함. 3가지 종류의 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 모두 최소검출한계(Limit of detection: LOD)가 10^1 이하로 확인되어 최종성과 목표인 10^2 copies/ μ l ~ 10^1 copies/ μ l 이하를 충분히 만족하는 것을 확인함. (그림 19~21)

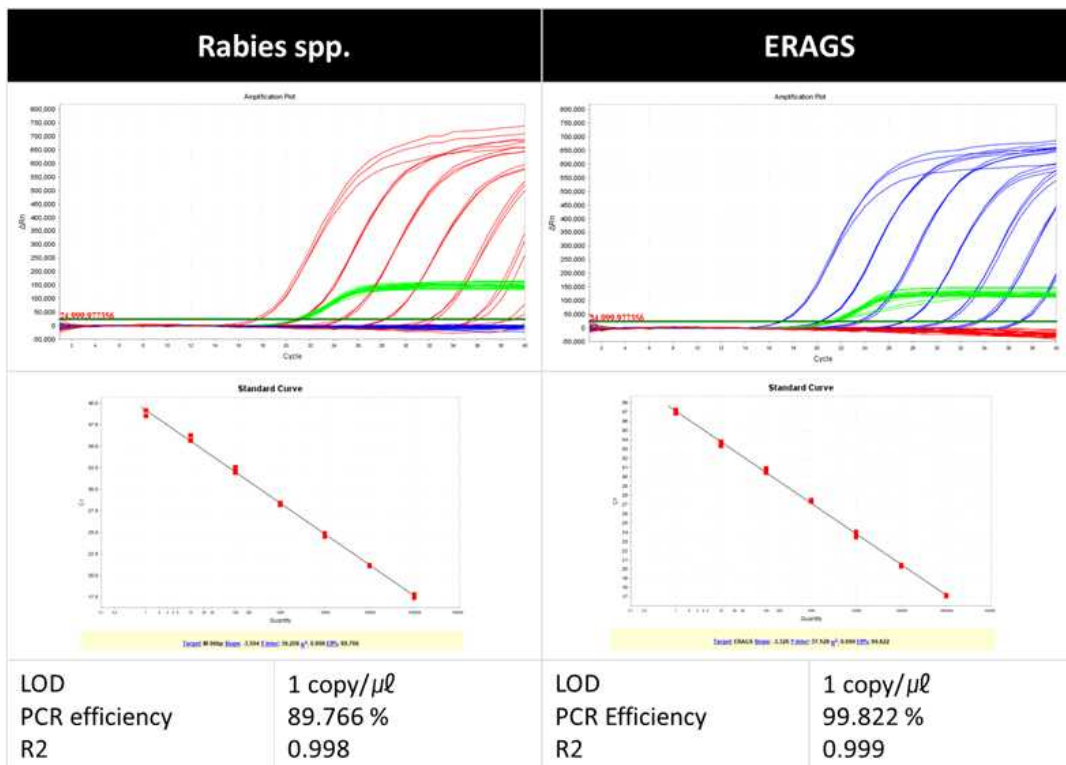


그림 19. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 분석적 민감도

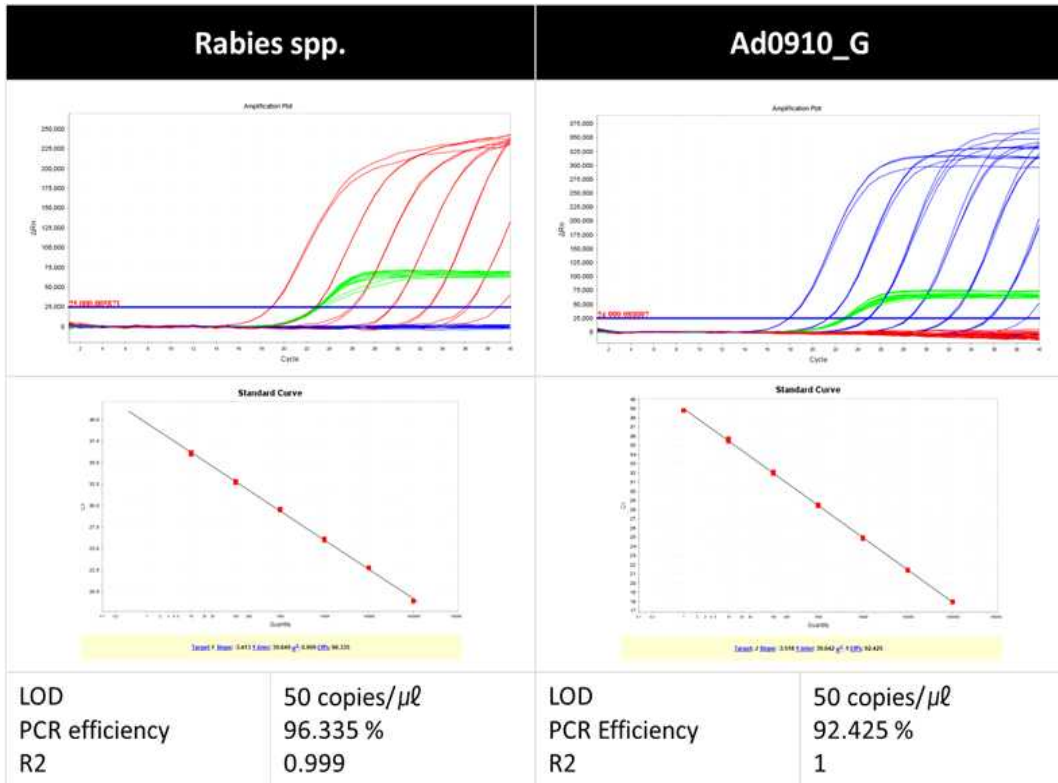


그림 20. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 분석적 민감도

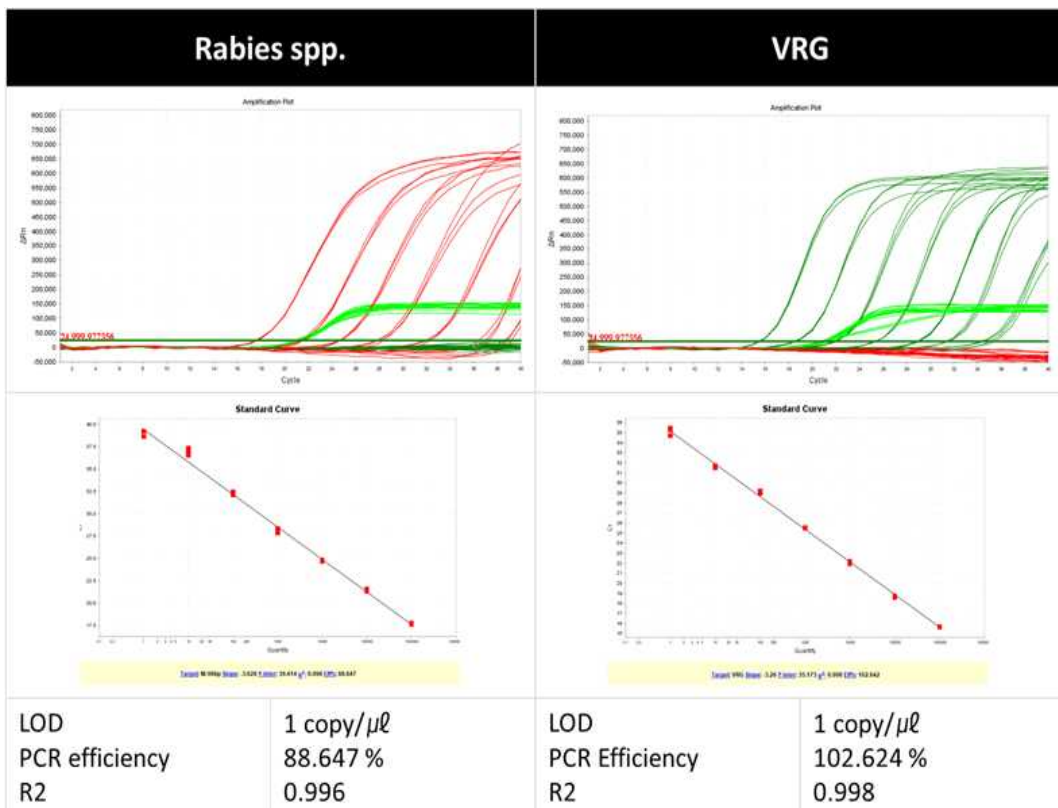
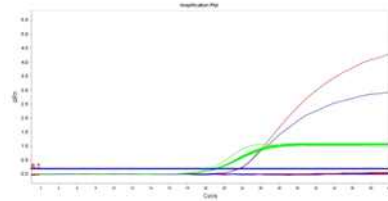


그림 21. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 분석적 민감도

나) 분석적 성능평가: 특이도

민감도 평가는 광견병바이러스 백신주와 인플루엔자바이러스, 호흡기바이러스, 박테리아, 그리고 동물 gDNA등을 이용하여 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 특이도를 평가함. 평가 결과 3가지의 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 모두 대상 시료 이외의 비 특이적 증폭은 발견되지 않았음. (그림 22~24)

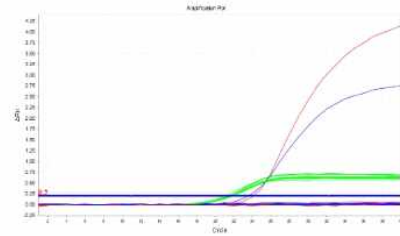
Category	Name	Reference	Result		
			Rabies spp.	ERAGS	IC
Rabies virus	광견병백신주 (ERAGS) RNA	KVCC 471600001	+	+	+
	광견병이가백신 주(viRG) DNA	KVCC 471600002	-	-	-
	광견병개조합백신주(Adeno-09100) DNA	KVCC 471600003	-	-	-
Influenza virus	AMPLIRUN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14100 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	16000 copies/μl	-	-	-
Respiratory virus	AMPLIRUN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype A)	19000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype B)	17500 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN MEASLES RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN RUBELLA RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-	-
	AMPLIRUN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-	-
Pathogenic bacteria	Bacillus cereus	KCTC 14612	-	-	-
	Bacillus subtilis	KCTC 2219	-	-	-
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-	-
	E. coli O157	NCCP 11090	-	-	-
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41637	-	-	-
	Clostridium perfringens	ATCC 12818	-	-	-
	Salmonella typhi	ATCC 19214	-	-	-
	Salmonella typhimurium	ATCC 29629	-	-	-
	Shigella sonnei	KCTC 22530	-	-	-
	Staphylococcus aureus	ATCC 10995	-	-	-
	Vibrio vulnificus	ATCC 27562	-	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41637	-	-	-
Legionella pneumophila	ATCC 33152	-	-	-	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-	-	
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 15531	-	-	-	
Other species	Human	Extraction DNA	-	-	-
	Dog	Extraction DNA	-	-	-
	Cow	Extraction DNA	-	-	-
	Porcine	Extraction DNA	-	-	-
	Chicken	Extraction DNA	-	-	-
	Duck	Extraction DNA	-	-	-
	Sheep	Extraction DNA	-	-	-
	Goat	Extraction DNA	-	-	-
Raccoon dog	Extraction DNA	-	-	-	



1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 9개

그림 22. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 분석적 특이도

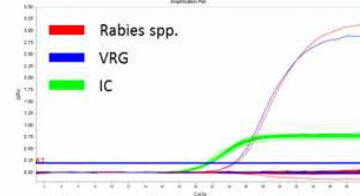
Category	Name	Reference	Result		
			Rabies spp.	Ad0910_G	IC
Rabies virus	광견병백신주 (ERAGS) RNA	KVCC476-00001	+	-	+
	광견병미기백신주 (VRG) DNA	KVCC476-00002	-	-	+
	광견병재조합백신주 (Adeno-0910G) DNA	KVCC476-00003	-	+	+
Influenza virus	AMPLIRUN INFLUENZA A H1 RNA CONTROL	14100 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14500 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN INFLUENZA A H5 RNA CONTROL	16000 esp-ica/µl	-	-	+
Respiratory virus	AMPLIRUN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 esp-ica/µl	-	+	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (subtype A)	19000 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (subtype B)	17500 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN MEASLES RNA CONTROL	14500 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RUBELLA RNA CONTROL	18000 esp-ica/µl	-	-	+
	AMPLIRUN MUMPS RNA CONTROL	18500 esp-ica/µl	-	-	+
Pathogenic bacteria	Bacillus cereus	KCTC 1012	-	-	+
	Bacillus subtilis	KCTC 2213	-	-	+
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-	+
	E. coli O157	NCCP 10990	-	-	+
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-	+
	Yersinia enterocolitica	KCM 41657	-	-	+
	Clostridium perfringens	ATCC 12916	-	-	+
	Salmonella typhi	ATCC 19214	-	-	+
	Salmonella typhimurium	ATCC 29629	-	-	+
	Shigella sonnei	KCTC 22530	-	-	+
	Staphylococcus aureus	ATCC 15905	-	-	+
	Vibrio vulnificus	ATCC 27562	-	-	+
	Yersinia enterocolitica	KCM 41657	-	-	+
	Legionella pneumophila	ATCC 33151	-	-	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-	+	
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 15581	-	-	+	
Other species	Human	Extraction DNA	-	-	+
	Dog	Extraction DNA	-	-	+
	Cow	Extraction DNA	-	-	+
	Porcine	Extraction DNA	-	-	+
	Chicken	Extraction DNA	-	-	+
	Duck	Extraction DNA	-	-	+
	Sheep	Extraction DNA	-	-	+
	Goat	Extraction DNA	-	-	+
	Raccoon dog	Extraction DNA	-	-	+



1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 9개

그림 23. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 분석적 특이도

Category	Name	Reference	Result		
			Rabies spp.	VRG	IC
Rabies virus	광견병백신주 (ERAGS) RNA	KVCC476-00001	+	-	+
	광견병미기백신주 (VRG) DNA	KVCC476-00002	-	+	+
	광견병재조합백신주 (Adeno-0910G) DNA	KVCC476-00003	-	+	+
Influenza virus	AMPLIRUN INFLUENZA A H1 RNA CONTROL	14100 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14500 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN INFLUENZA A H5 RNA CONTROL	16000 copies/µl	-	-	+
Respiratory virus	AMPLIRUN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (subtype A)	19000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (subtype B)	17500 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN MEASLES RNA CONTROL	14500 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN RUBELLA RNA CONTROL	18000 copies/µl	-	-	+
	AMPLIRUN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/µl	-	-	+
Pathogenic bacteria	Bacillus cereus	KCTC 1012	-	-	+
	Bacillus subtilis	KCTC 2213	-	-	+
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-	+
	E. coli O157	NCCP 10990	-	-	+
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-	+
	Yersinia enterocolitica	KCM 41657	-	-	+
	Clostridium perfringens	ATCC 12916	-	-	+
	Salmonella typhi	ATCC 19214	-	-	+
	Salmonella typhimurium	ATCC 29629	-	-	+
	Shigella sonnei	KCTC 22530	-	-	+
	Staphylococcus aureus	ATCC 15905	-	-	+
	Vibrio vulnificus	ATCC 27562	-	-	+
	Yersinia enterocolitica	KCM 41657	-	-	+
	Legionella pneumophila	ATCC 33151	-	-	+
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-	+	
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 15581	-	-	+	
Other species	Human	Extraction DNA	-	-	+
	Dog	Extraction DNA	-	-	+
	Cow	Extraction DNA	-	-	+
	Porcine	Extraction DNA	-	-	+
	Chicken	Extraction DNA	-	-	+
	Duck	Extraction DNA	-	-	+
	Sheep	Extraction DNA	-	-	+
	Goat	Extraction DNA	-	-	+
	Raccoon dog	Extraction DNA	-	-	+



→ 모든 샘플에서 음성 판정 (미증폭).

1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 8개

그림 24. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 분석적 특이도

다) 분석적 성능평가: 정밀도

실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 정밀도를 평가하기 위해 두 명의 시험자가 3가지 농도의 양성시료를 5일 동안 1일 1회, 2반복 시험하여 평가함. 평가 결과 모든 진단법의 시험자간, 일간, 실험간 정밀도 평가에서 결과의 밀집도를 나타내는 CV(Coefficient of variaton; 분산계수)값이 5% 이내인 것을 확인하여 정밀도에 이상이 없음을 확인함. (표 7~12)

표 7. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 정밀도, Rabies spp.

Rabies (Rabies/Ad0910_G)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	20.4	0.0	0.0
	Middle	26.8	0.0	0.1
	Low	33.0	0.0	0.1
Between Day	High	20.4	0.0	0.1
	Middle	26.8	0.0	0.2
	Low	33.0	0.0	0.1
Between Run	High	20.4	0.0	0.1
	Middle	26.8	0.1	0.2
	Low	33.0	0.1	0.3

표 8. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 정밀도, ERAGS

ERAGS (Rabies/ERAGS)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	20.7	0.0	0.0
	Middle	26.8	0.0	0.1
	Low	32.9	0.0	0.1
Between Day	High	20.7	0.1	0.2
	Middle	26.8	0.0	0.1
	Low	32.9	0.1	0.3
Between Run	High	20.7	0.1	0.3
	Middle	26.8	0.0	0.1
	Low	32.9	0.2	0.5

표 9. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 정밀도, Rabies spp.

Rabies (Rabies/Ad0910_G)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	20.4	0.0	0.0
	Middle	26.8	0.0	0.1
	Low	33.0	0.0	0.1
Between Day	High	20.4	0.0	0.1
	Middle	26.8	0.0	0.2
	Low	33.0	0.0	0.1
Between Run	High	20.4	0.0	0.1
	Middle	26.8	0.1	0.2
	Low	33.0	0.1	0.3

표 10. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 정밀도, Ad0910_G

Ad0910_G (Rabies/Ad0910_G)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	20.3	0.0	0.0
	Middle	27.2	0.0	0.1
	Low	33.5	0.1	0.3
Between Day	High	20.3	0.0	0.1
	Middle	27.2	0.1	0.2
	Low	33.5	0.1	0.2
Between Run	High	20.3	0.0	0.2
	Middle	27.2	0.1	0.3
	Low	33.5	0.1	0.4

표 11. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 정밀도, Rabies spp.

Rabies (Rabies/VRG)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	20.5	0.0	0.0
	Middle	27.1	0.0	0.1
	Low	33.6	0.1	0.2
Between Day	High	20.5	0.0	0.1
	Middle	27.1	0.1	0.2
	Low	33.6	0.1	0.4
Between Run	High	20.5	0.0	0.1
	Middle	27.1	0.1	0.2
	Low	33.6	0.2	0.5

표 12. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 정밀도, VRG

VRG (Rabies/VRG)	Template conc.	Ct mean	SD	CV (%)
Between tester	High	18.8	0.0	0.0
	Middle	25.3	0.0	0.1
	Low	31.4	0.0	0.2
Between Day	High	18.8	0.0	0.1
	Middle	25.3	0.1	0.4
	Low	31.4	0.1	0.4
Between Run	High	18.8	0.0	0.2
	Middle	25.3	0.1	0.5
	Low	31.4	0.2	0.6

이상의 분석적 성능평가를 통해 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 3종의 성능이 진단키트로 충분히 사용할 수 있음을 확인함.

라) 임상적 성능평가

실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단 키트 3종의 임상시료 적용가능성을 확인하기 위해 포획된 야생 너구리 중 광견병 바이러스 음성개체에 미끼백신을 투여함. 투여된 백신은 1차 ERAGS, Ad0910_G, VRG 백신주, 2차 ERAGS, VRG 백신주를 투여하였고 투여된 개체에서는 구강 면봉 및 채혈을 통해 광견병 바이러스 백신 유효성 평가를 위한 시료를 확보함. 이렇게 확보된 임상시료를 이용하여 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단 키트 3종의 성능을 확인한 결과 미끼백신 투여 후 초기에만 확인이 되는 것을 확인함. 이를 통해 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단 키트 3종의 성능이 진단키트로 충분히 사용할 수 있음을 확인함. (표 13~15)

표 13. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템을 이용한 임상시료 분석 결과

Group		Sample name	Rabies spp.	ERAGS	EPC
Control	1747	8/8 Control 17:30	-	-	23.1
		8/9 Control 09:30	-	-	23.1
		8/9 Control 17:30	-	-	23
		8/10 Control 09:30	-	-	22.9
		8/10 Control 17:30	-	-	22.8
		8/11 Control 09:30	-	-	22.8
		8/11 Control 17:30	-	-	23
ERAGS	6-943	6/13 ERAGS 10:40	34.2	34	24
		6/13 ERAGS 17:00	38.5	38.3	23.1
		6/14 ERAGS 9:30	39.2	39.4	23
		6/14 ERAGS 17:00	-	-	23.3
		6/15 ERAGS 9:30	-	-	23.1
		6/15 ERAGS 19:30	-	-	23.1
		6/16 ERAGS 9:30	-	-	23.1
		6/16 ERAGS 17:30	-	-	23.1

표 14. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템을 이용한 임상시료 분석결과

Group		Sample name	Rabies spp.	VRG	EPC
Control	1747	8/8 Control 17:30	-	-	23
		8/9 Control 09:30	-	-	23
		8/9 Control 17:30	-	-	22.8
		8/10 Control 09:30	-	-	22.9
		8/10 Control 17:30	-	-	22.8
		8/11 Control 09:30	-	-	23
		8/11 Control 17:30	-	-	23
VRG	3945	8/8 VRG 17:30	-	25.1	22.9
		8/9 VRG 09:30	-	-	22.9
		8/9 VRG 17:30	-	-	22.7
		8/10 VRG 09:30	-	-	22.8
		8/10 VRG 17:30	-	-	22.8
		8/11 VRG 09:30	-	-	23
		8/11 VRG 17:30	-	-	23

표 15. 야생형 광견병 바이러스 / Ad910_G 백신주 진단시스템을 이용한 임상시료 분석결과

Group		Sample name	Rabies spp.	Ad910_G	EPC
Control	1747	8/8 Control 17:30	-	-	23
		8/9 Control 09:30	-	-	23
		8/9 Control 17:30	-	-	22.9
		8/10 Control 09:30	-	-	22.7
		8/10 Control 17:30	-	-	22.8
		8/11 Control 09:30	-	-	22.8
		8/11 Control 17:30	-	-	22.8
Ad0910_G	142A	9/7 Ad0910_G	-	34	23
		9/8 Ad0910_G	-	36.4	23
		9/9 Ad0910_G	-	-	22.8
		9/10 Ad0910_G	-	37	22.9
		9/11 Ad0910_G	-	-	22.8
		9/12 Ad0910_G	-	-	22.9
		9/13 Ad0910_G	-	-	22.7

2차년도 연구성과

나. 유전자증폭기법을 기반으로한 광견병 유전자 진단법 개발

2) 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 프라이머 제작

가) 유전자 증폭기법을 이용한 야생형 광견병 바이러스 진단용 프라이머 개발

1차년도 문헌조사를 통해 확보한 한국형 광견병 바이러스 염기서열을 이용하여 야생형 광견병 바이러스 진단용 유전자 증폭기법 프라이머를 제작함. (그림 25)

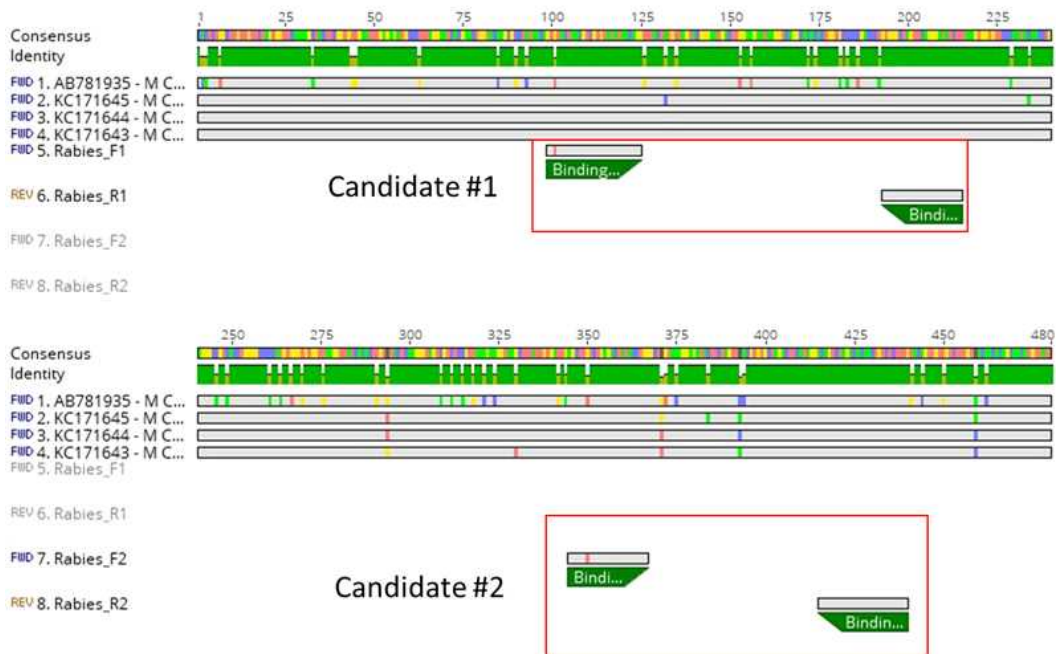


그림 25. 야생형 광견병 바이러스 진단용 유전자증폭기법 프라이머 후보 제작

- 나) 유전자 증폭기법을 이용한 ERAGS 백신주 진단용 프라이머 개발
 문헌조사를 통해 확보된 ERAGS 백신주 염기서열과 야생형 광견병 바이러스 염기서열을 비교 분석하여 ERAGS 백신주에서만 특이적으로 증폭될 수 있는 유전자 증폭기법용 프라이머를 제작함. (그림 26)

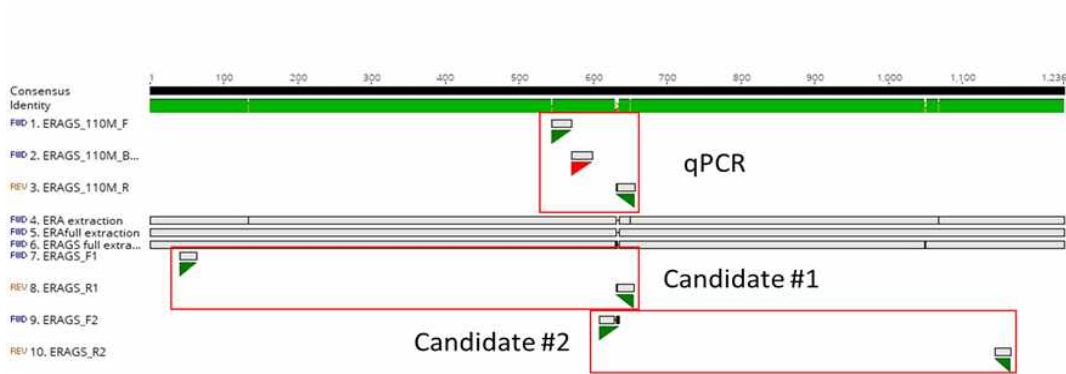


그림 26. 야생형광견병 바이러스(ERA strain) 염기서열과 광견병 바이러스 백신주 (ERAGS strain) 염기서열을 이용한 ERAGS 백신주 특이적 유전자 증폭기법용 프라이머 후보

다) 유전자 증폭기법을 이용한 Ad0910_G 백신주 진단용 프라이머 개발
 문헌조사를 통해 확보된 Ad0910_G 백신주 염기서열을 비교 분석하여 Ad910_G 백
 신주에서만 특이적으로 존재하는 아데노바이러스와 광견병바이러스 시퀀스 연결부위
 를 증폭할 수 있는 유전자 증폭기법용 프라이머를 제작함. (그림 27)

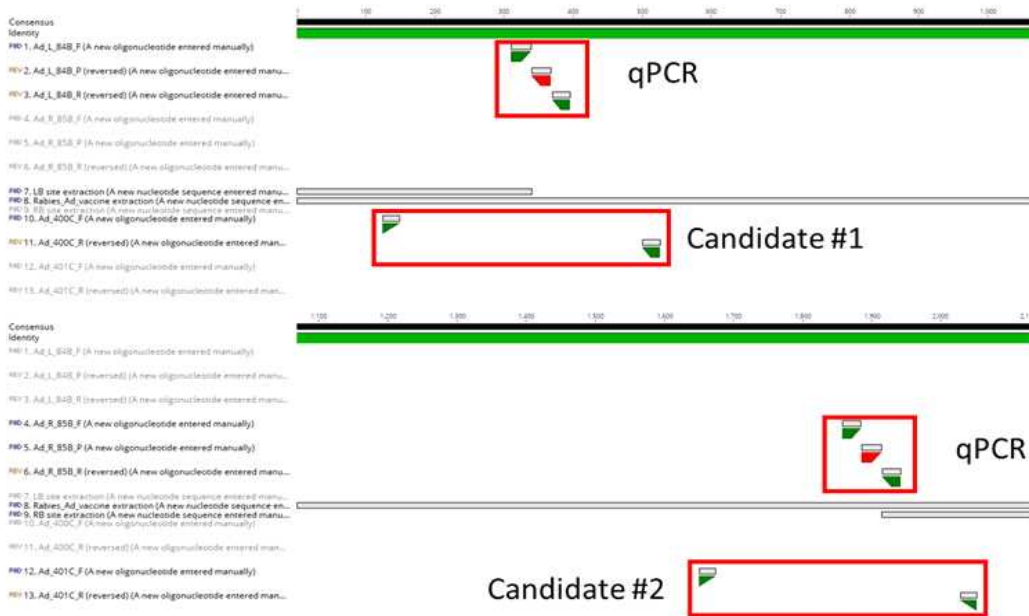


그림 27. Ad0910_G 백신주 염기서열을 이용한 Ad0910_G 백신주 특이적 유전자 증
 폭기법용 프라이머 후보

라) 유전자 증폭기법을 이용한 VRG 백신주 진단용 프라이머 개발
 문헌조사를 통해 확보한 VRG 백신주 구조로 VRG 백신의 염기서열을 확보한 후 해당
 염기서열을 이용하여 VRG 백신주 특이적 유전자 증폭기법용 프라이머 후보를 제작함.
 (그림 28)



그림 28. VRG 백신주 염기서열을 이용한 VRG 백신주 특이적 유전자 증폭장치용 프
 라이머 후보

3) 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 관련 타겟에 대한 싱글시스템 제작
 가) 야생형 광견병 바이러스 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작

야생형 광견병 바이러스 특이적 유전자 증폭 진단 싱글시스템은 야생형 광견병 바이러스 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머, 프로브 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 제작되었고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 야생형 광견병 바이러스의 돌연변이 백신주인 ERAGS gRNA를 사용함. 유전자 증폭기법 기반 광견병 유전자 진단법 관련 타겟에 대한 싱글시스템 제작에는 모두 동일한 양의 프라이머, Premix를 사용하였고 동일한 반응조성으로 실험함. (표 16~18) 야생형 광견병 바이러스 특이적 유전자 증폭 진단 싱글시스템 시험결과 두 가지 야생형 광견병 바이러스 특이적 유전자 증폭장치용 프라이머 후보 모두 정상적으로 증폭되는 것을 확인하였고 상대적으로 비특이적 증폭량이 더 적은 후보 1을 선정. (그림 29)

표 16. 싱글시스템 제작 시 사용된 프라이머 농도

Target	Final concentration (nM)	
	Forward primer	Reverse primer
Candidate #1	500	500
Candidate #2	500	500

표 17. 싱글시스템 제작시 사용된 반응액 조성

Component	Volume (μl)
25x Enzyme mix	0.8
2x Reaction buffer	10.0
Primer mix	1.0
D.W.	3.2
Template	5.0
Total	20.0

표 18. 싱글시스템 제작 시 사용된 유전자 증폭장치 반응조건

Temperature	Time	Cycle
50 °C	30 min	1
94 °C	15 min	1
94 °C	30 sec	35
60 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1
4 °C	-	

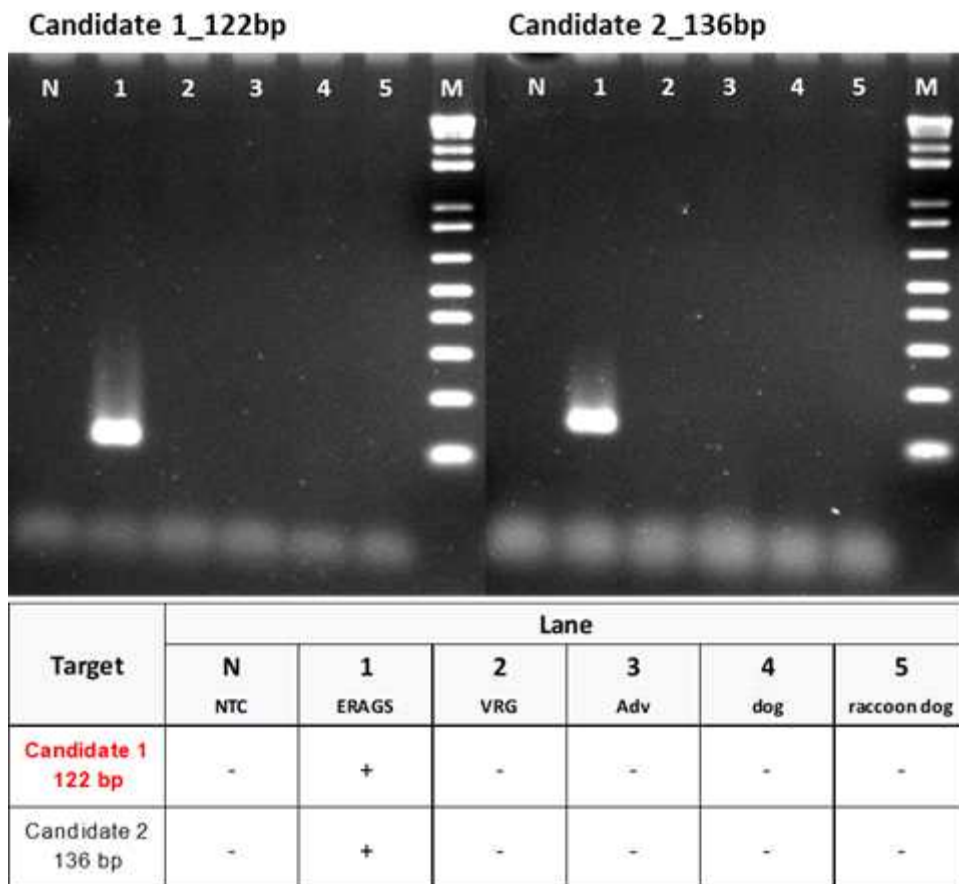


그림 29. 유전자 증폭기법 기반 야생형 광견병 바이러스 진단 싱글시스템 제작

나) ERAGS 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작

ERAGS 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 ERAGS 백신주 특이적 유전자 증폭장치용 프라이머 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 야생형 광견병 바이러스의 돌연변이 백신주인 ERAGS gRNA를 사용함. 시험결과 두 가지 ERAGS 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머 후보 중 상대적으로 증폭 효율이 좋은 후보 1을 선정. (그림 30)

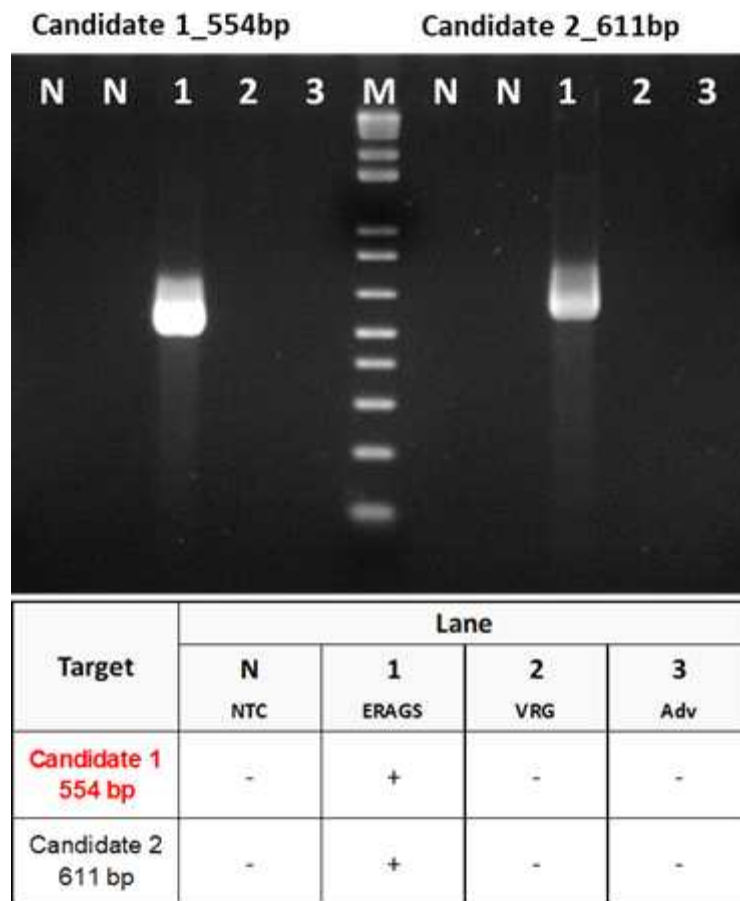


그림 30. 유전자 증폭기법 기반 ERAGS 백신주 진단 싱글시스템 제작

다) Ad0910_G 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작

Ad0910_G 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 Ad0910_G 백신주 특이적 유전자 증폭장치용 프라이머 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 Ad0910_G 백신주 gRNA를 사용함. 시험결과 두 가지 Ad0910_G 백신주 특이적 유전자 증폭장치용 프라이머 후보 모두 Ad0910_G 백신주 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 그중 증폭효율이 좀 더 좋은 후보 2를 선정. (그림 31)

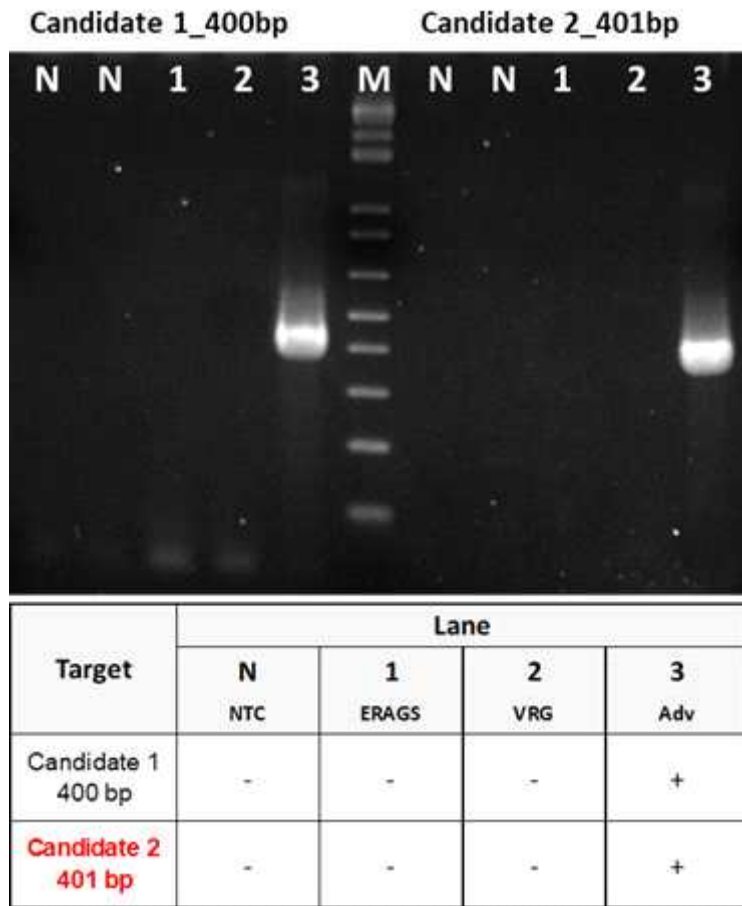


그림 31. 유전자 증폭기법 기반 Ad0910_G 백신주 진단 싱글시스템 제작

라) VRG 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작

VRG 백신주 특이적 유전자 증폭 진단시스템 제작을 위해 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머 후보와 PowerAmp™ One Step RT-PCR Kit(A0001)을 이용하여 싱글시스템을 제작하였고 각각의 후보에 대한 양성시료로는 VRG 백신주 gRNA를 사용함. 시험결과 VRG 백신주 특이적 실시간 유전자 증폭장치용 프라이머 후보가 VRG 백신주 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였고 상대적으로 비특이적 증폭량이 더 적은 후보 2를 선정. (그림 32)

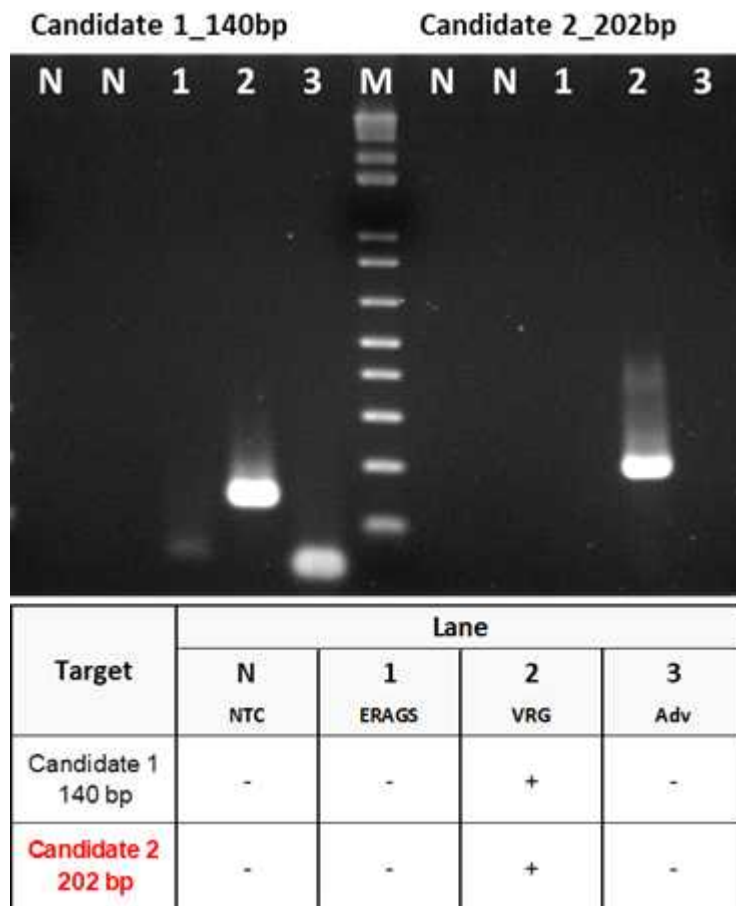


그림 32. 유전자 증폭기법 기반 VRG 백신주 진단 싱글시스템 제작

4) Multiplex inhibition test를 통한 조합선정

가) 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test
 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머와 ERAGS 백신주 특이적 프라이머를 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용된 모든 프라이머 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함. 시험결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수하여 해당 조합을 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로 선정. (그림 33)

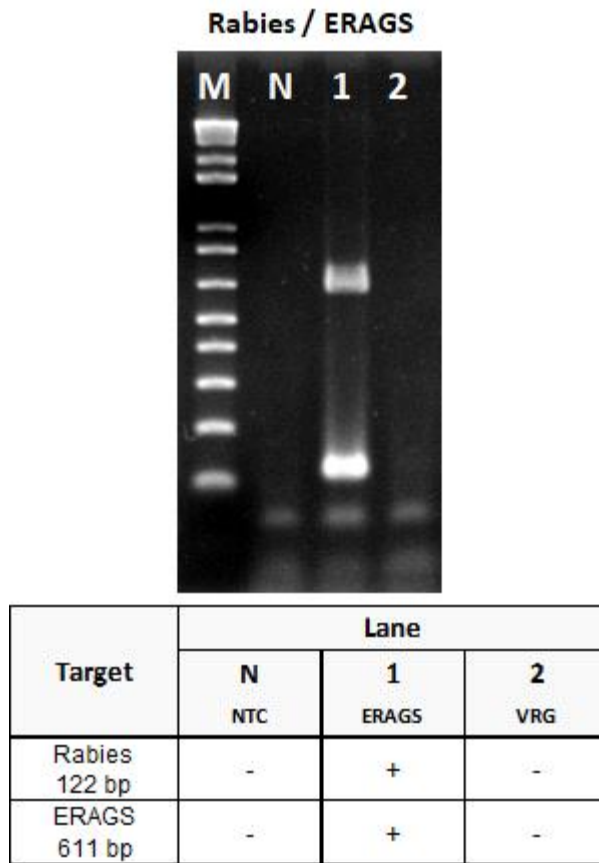


그림 33. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

나) 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test
 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를
 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머와
 Ad0910_G 백신주 특이적 프라이머를 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용
 된 모든 프라이머 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함. 시험
 결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수하여 해당 조합을
 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로 선
 정. (그림 34)

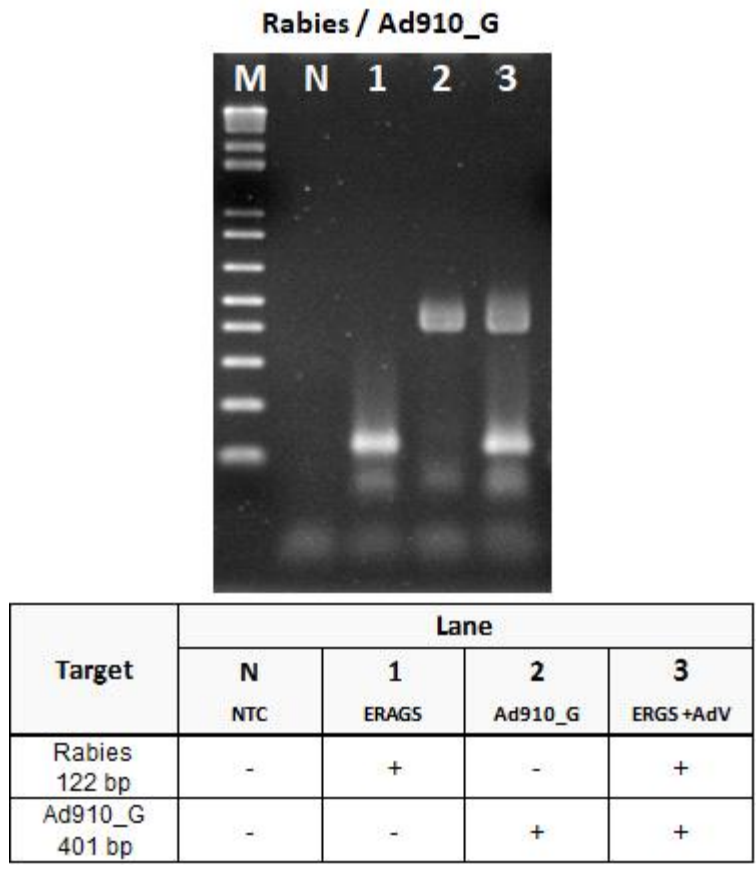


그림 34. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

다) 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test
 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test를 진행하기 위해 싱글시스템이 확인된 야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머와 VRG 백신주 특이적 프라이머를 혼합하여 동시 검출 가능여부를 확인함. 사용된 모든 프라이머 및 시약의 조건은 싱글시스템에 사용된 것과 동일하게 사용함. 시험결과 싱글시스템과 멀티시스템 사이의 차이가 적고 증폭효율이 우수하여 해당 조합을 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템에 대한 멀티시스템으로 선정. (그림 35)

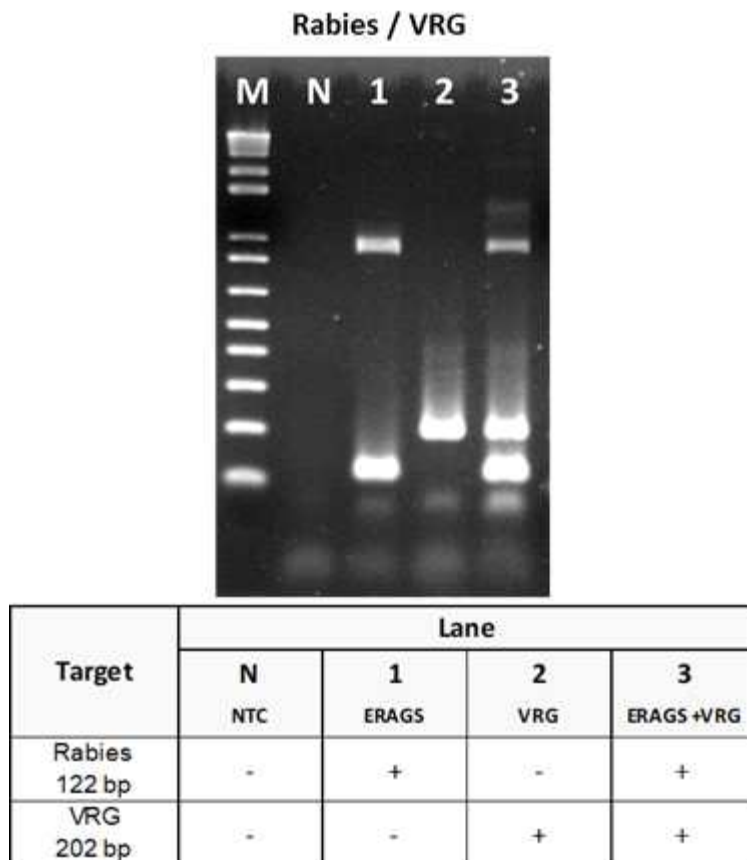


그림 35. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 multiplex inhibition test

최종적으로 확정된 프라이머, 프로브의 염기서열 정보 및 사용량은 표 19과 같다.

표 19. 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 프라이머 정보

조성분	타겟	타입	염기서열	증폭 산물 크기 (bp)	농도 (nM)
Rabies/VRG cPCR multiplex	RABV	Forward primer	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	122	500
		Reverse primer	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC		500
	VRG	Forward primer	CGG TAA GGA AGT AGA ATC ATA AAG AAC AGT	202	500
		Reverse primer	TAA ATA GGG AAT TTC CCA AAA CAC AAT		500
Rabies/ERAGS cPCR multiplex	RABV	Forward primer	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	122	500
		Reverse primer	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC		500
	ERAGS	Forward primer	GGT CTA CCT ACT GCT CCA CTA ACC AC	611	500
		Reverse primer	GGA TGC TCT CTT CCC TCT ACT GGA		500
Rabies/Ad0910_G cPCR multiplex	RABV	Forward primer	GGA ATA TGT CCC GCT GAA AGA AC	122	500
		Reverse primer	GAG TAA CCA TTT GGG CTA CAC ACT TTA AC		500
	Ad-0910G	Forward primer	AAA AGC GGA GGT GAG ACC AGA CT	401	500
		Reverse primer	GTT AGG GAT AGG CTT ACC TTC GAA CC		500

5) 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 성능평가

유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 성능을 평가하기 위해 분석적 성능평가를 수행함. 분석적 성능평가를 통해 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 민감도, 특이도를 확인함.

가) 분석적 성능평가: 민감도

민감도 평가는 농림축산검역본부에서 분양받은 각 백신주별 양성시료를 이용한 in vitro transcript 또는 plasmid DNA를 10^6 copies/ μ l ~ 10^0 copies/ μ l 까지 10배씩 serial dilution 하여 사용함. 3가지 종류의 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 모두 최소검출한계 (Limit of detection: LOD)가 10^1 이하로 확인되어 최종성과 목표인 10^2 copies/ μ l ~ 10^1 copies/ μ l 이하를 충분히 만족하는 것을 확인함. (그림 36~38)

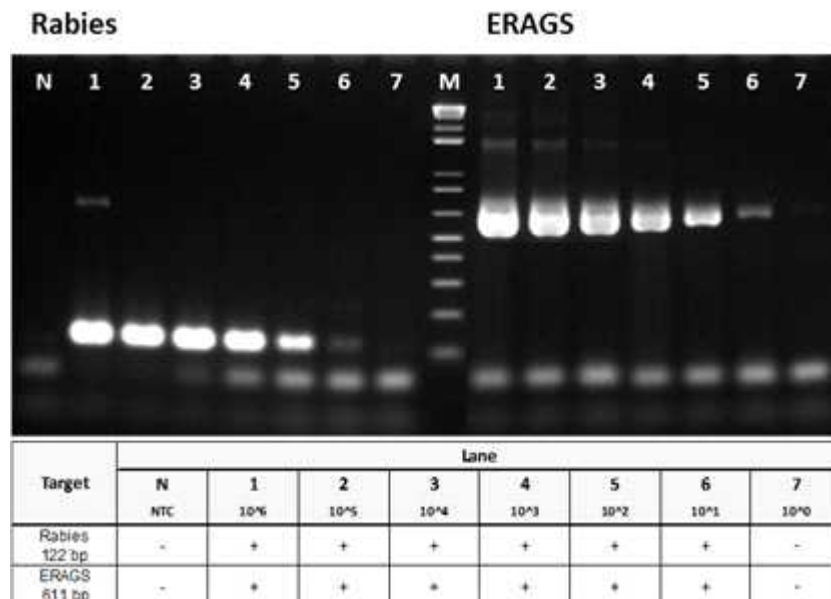


그림 36. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 분석적 민감도

야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머와 ERAGS 백신주 특이적 프라이머의 검출한계는 10^1 copies/ μ l

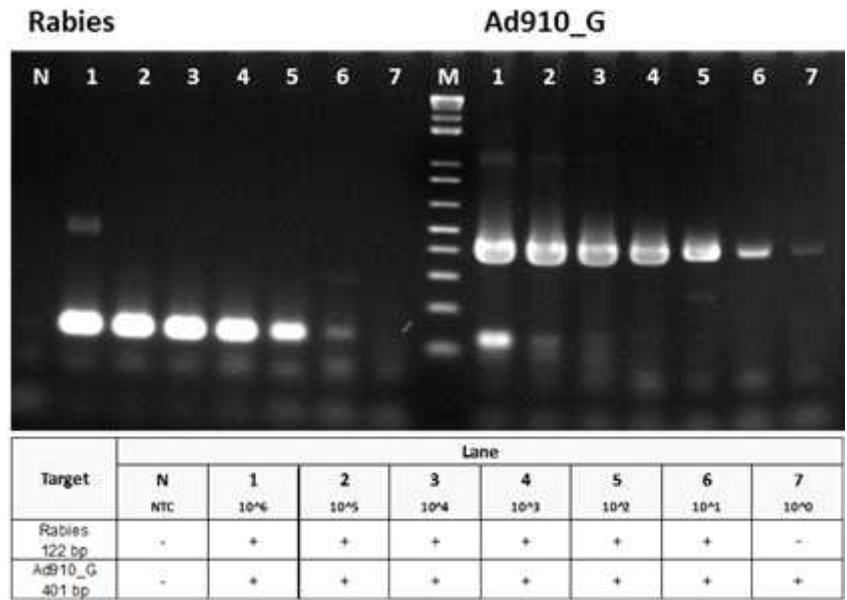


그림 37. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 분석적 민감도
야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머의 검출한계는 10^1 copies/ μ l,
Ad910_G백신주 특이적 프라이머의 검출한계는 10^0 copy/ μ l

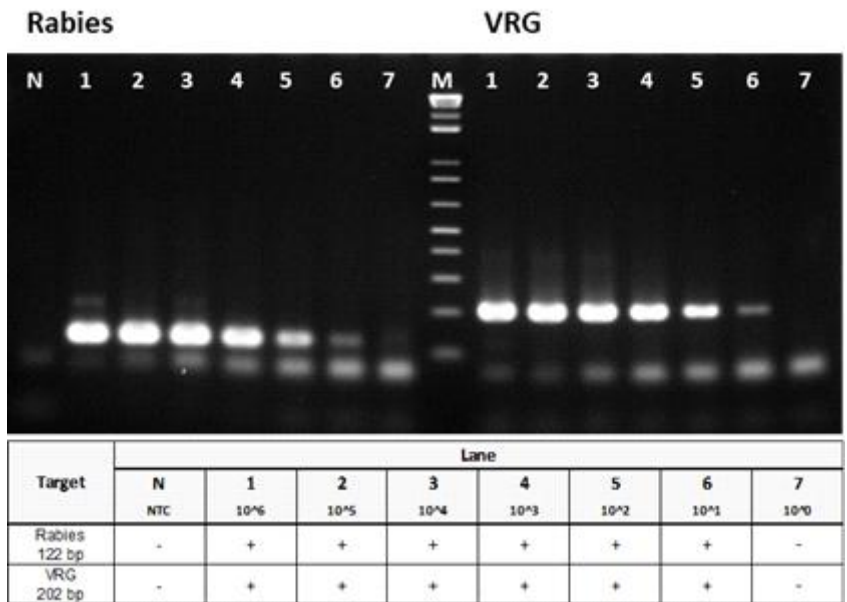


그림 38. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 분석적 민감도
야생형 광견병 바이러스 특이적 프라이머와 ERAGS 백신주 특이적 프라이
머의 검출한계는 10^1 copies/ μ l

나) 분석적 성능평가: 특이도

특이도 평가는 광견병바이러스 백신주와 인플루엔자바이러스, 호흡기바이러스, 박테리아, 그리고 동물 gDNA등을 이용하여 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법의 특이도를 평가함. 평가 결과 3가지의 실시간 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 모두 대상 시료 이외의 비 특이적 증폭은 발견되지 않았음. (그림 39~41)

Category	Name	Reference	Result	
			Rabies spp.	ERAGS
Rabies virus	광견병백신주 (ERAGS) RNA	KVCC-ET1800001	+	+
	광견병미립백신주(VVRG) DNA	KVCC-ET1800002	-	-
	광견병재조합백신주(Adeno-0910G) DNA	KVCC-ET1800003	-	-
Influenza virus	AMPIURIN INFLUENZA A H1 RNA CONTROL	14100 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H5 RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 copies/μl	-	-
Respiratory virus	AMPIURIN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype A)	19500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype B)	17500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MEASLES RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RUBELLA RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
Pathogenic bacteria	AMPIURIN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-
	Bacillus cereus	KCTC 1012	-	-
	Bacillus subtilis	KCTC 2213	-	-
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-
	E.coli O157	NCCP 11000	-	-
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Clostridium perfringens	ATCC 12916	-	-
	Salmonella typhi	ATCC 18724	-	-
	Salmonella typhimurium	ATCC 29629	-	-
	Shigella sonnei	KCTC 22930	-	-
	Staphylococcus aureus	ATCC 10995	-	-
	Vibrio vulnificus	ATCC 27542	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Legionella pneumophila	ATCC 35162	-	-
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 19533	-	-	
Other species	Human	Extraction DNA	-	-
	Dog	Extraction DNA	-	-
	Cow	Extraction DNA	-	-
	Porcine	Extraction DNA	-	-
	Chicken	Extraction DNA	-	-
	Duck	Extraction DNA	-	-
	Sheep	Extraction DNA	-	-
Goat	Extraction DNA	-	-	
Raccoon dog	Extraction DNA	-	-	



1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 9개

그림 39. 야생형 광견병 바이러스 / ERAGS 백신주 진단시스템 분석적 특이도

Category	Name	Reference	Result	
			Rabies spp.	VRG
Rabies virus	광견병백신주 (FRAGS) RNA	KVCC 471800001	*	*
	광견병미립백신주(VRG) DNA	KVCC 471800002	-	*
	광견병재조합백신주(Adeno-0910G) DNA	KVCC 471800003	-	*
Influenza virus	AMPIURIN INFLUENZA A H1 RNA CONTROL	14100 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H5 RNA CONTROL	16000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 copies/μl	-	-
Respiratory virus	AMPIURIN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype A)	19000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype B)	17500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MEASLES RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RUBELLA RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-
Pathogenic bacteria	Bacillus cereus	KCTC 10312	-	-
	Bacillus subtilis	KCTC 2213	-	-
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-
	E.coli O157	NCCP 61090	-	-
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Giardia lamblia	ATCC 12916	-	-
	Salmonella typhi	ATCC 19714	-	-
	Salmonella typhimurium	ATCC 19619	-	-
	Shigella sonnei	KCTC 22530	-	-
Other species	Staphylococcus aureus	ATCC 18959	-	-
	Vibrio vulnificus	ATCC 27542	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Legionella pneumophila	ATCC 33152	-	-
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-
	Mycobacterium tuberculosis	ATCC 19531	-	-
	Human	Extraction DNA	-	-
	Dog	Extraction DNA	-	-
	Cow	Extraction DNA	-	-
	Porcine	Extraction DNA	-	-
Other species	Chicken	Extraction DNA	-	-
	Duck	Extraction DNA	-	-
	Sheep	Extraction DNA	-	-
	Goat	Extraction DNA	-	-
	Raccoon dog	Extraction DNA	-	-



1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 9개

그림 40. 야생형 광견병 바이러스 / Ad0910_G 백신주 진단시스템 분석적 특이도

Category	Name	Reference	Result	
			Rabies spp.	Ad010_G
Rabies virus	광견병백신주 (FRAGS) RNA	KVCC 471800001	*	*
	광견병미립백신주(VRG) DNA	KVCC 471800002	-	-
	광견병재조합백신주(Adeno-0910G) DNA	KVCC 471800003	-	*
Influenza virus	AMPIURIN INFLUENZA A H1 RNA CONTROL	14100 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H3 RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN INFLUENZA A H5 RNA CONTROL	16000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN ADENOVIRUS DNA CONTROL	11000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 1 RNA CONTROL	13000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 2 RNA CONTROL	12500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN PARAINFLUENZA 3 RNA CONTROL	17000 copies/μl	-	-
Respiratory virus	AMPIURIN CORONAVIRUS RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype A)	19000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS(subtype B)	17500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MEASLES RNA CONTROL	14500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN RUBELLA RNA CONTROL	18000 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-
	AMPIURIN MUMPS RNA CONTROL	18500 copies/μl	-	-
Pathogenic bacteria	Bacillus cereus	KCTC 10312	-	-
	Bacillus subtilis	KCTC 2213	-	-
	Campylobacter jejuni	ATCC 33250	-	-
	E.coli O157	NCCP 61090	-	-
	Listeria monocytogenes	ATCC 19113	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Giardia lamblia	ATCC 12916	-	-
	Salmonella typhi	ATCC 19714	-	-
	Salmonella typhimurium	ATCC 19619	-	-
	Shigella sonnei	KCTC 22530	-	-
Other species	Staphylococcus aureus	ATCC 18959	-	-
	Vibrio vulnificus	ATCC 27542	-	-
	Yersinia enterocolitica	KCCM41887	-	-
	Legionella pneumophila	ATCC 33152	-	-
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	-	-
	Mycobacterium tuberculosis	ATCC 19531	-	-
	Human	Extraction DNA	-	-
	Dog	Extraction DNA	-	-
	Cow	Extraction DNA	-	-
	Porcine	Extraction DNA	-	-
Other species	Chicken	Extraction DNA	-	-
	Duck	Extraction DNA	-	-
	Sheep	Extraction DNA	-	-
	Goat	Extraction DNA	-	-
	Raccoon dog	Extraction DNA	-	-



1. 광견병바이러스 / 백신주: 3개
2. 인플루엔자바이러스: 3개
3. 호흡기바이러스: 10개
4. 박테리아: 16개
5. 동물 gDNA: 9개

그림 41. 야생형 광견병 바이러스 / VRG 백신주 진단시스템 분석적 특이도

이상의 분석적 성능평가를 통해 유전자 증폭기법 기반 광견병 바이러스 진단법 3종의 성능이 진단키트로 충분히 사용할 수 있음을 확인함.

다) 기존 진단법과의 비교 평가

과제를 통해 개발된 진단법의 성능을 확인하기 위해 기존에 사용중인 또는 알려진 검사법을 이용함. 확인결과 “재조합 광견병 바이러스, 이를 포함하는 광견병 예방용 백신 조성물 및 야외 광견병 바이러스와의 감별을 위한 멀티플렉스 RT-PCR(공개번호: 10-2015-0138956, 이후 선행기술 1)”⁷⁾과 “광견병 유전자검사법(동물질병 표준진단 요령/농림축산검역본부(2015), 이후 선행기술 2)”⁸⁾ 2종류의 선행기술을 확인함. 해당 검사법을 각 검사법에 명시된 염기서열의 프라이머와 사용량을 이용하여 본 과제를 통해 개발된 진단법과 검출 성능을 비교 평가함. (그림 42~43)



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138066
(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/02 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0088041
(22) 출원일자 2014년05월30일
실사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인
대한민국(관리부서 : 농림축산식품부 농림축산검역본부)

개인정보보호

(72) 발명자
양동문

개인정보보호

나진주

개인정보보호

(74) 대리인
이종우

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 재조합 광견병 바이러스, 이를 포함하는 광견병 예방용 백신 조성물 및 상기 광견병 바이러스와의 결합을 위한 멀티플렉스 RT-PCR

(67) 요약

본 발명은 재조합 광견병 바이러스, 이를 포함하는 광견병 예방용 백신 조성물 및 상기 광견병 바이러스와의 결합을 위한 멀티플렉스 RT-PCR에 관한 것으로, 구체적으로 광견병 바이러스의 G 단백질에서 333번째 아미노산이 글루탐산으로 치환되고 104번째 아미노산이 세린으로 치환되어 안정성과 효능이 우수한 재조합 광견병 바이러스

실시에 5, 광견병 아피바이러스와 미역백신주인 ERAG5 균주를 감별하는 프라이머에 대한 효율성 평가

재조합 광견병 바이러스 ERAG5는 G 단백질의 염기서열 637부터 639번째까지TCC의 뉴클레오타이드를 그리고 1054 - 1055번째까지 GA의 뉴클레오타이드를 가지고 있어 상기 광견병바이러스 및 ERA 균주와 특이적으로 다르다. 이를 바탕으로 ERAG5단을 특이적으로 인식하는 프라이머를 제작하였다. 전방향 프라이머(forward primer)는 G 단백질을 코딩하는 유전자 617 - 639번째에 해당하는 염기서열(TGCTTGTGACATTTTACCtcc)이며, 역방향 프라이머(reverse primer)는 G 단백질을 코딩하는 유전자 1075 - 1054 번째의 염기서열(GGATGATCTCATTCCAGTTtc)로 450bp를 증폭한다.

재조합 광견병 바이러스 ERAG5와 상기 광견병바이러스를 공통적으로 증폭하는 프라이머는 H 단백질을 코딩하는 유전자 351 - 514번째의 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머로 증폭크기는 183bp에 달한다. 공통 프라이머의 전방향 프라이머는 H 단백질을 코딩하는 유전자 351 - 372번째의 염기서열(AGGRAATTGGGCTTTGACTGGA)로 이루어지며, 역방향 프라이머는 533 - 514번째의 염기서열(AAGGGGCTGTCTCGAAAT)로 이루어진다.

One-step multiplex RT-PCR 에 사용된 프라이머

서열번호	프라이머명	염기서열	방향	유전자	목적 결합물
1	ERAG5-F	TGCTTGTGACATTTTACCtcc	Forward	G	ERAG5
2	ERAG5-R	GGATGATCTCATTCCAGTTtc	Reverse	G	ERAG5
3	ComRABVF	AGGRAATTGGGCTTTGACTGGA	Reverse	H	ERA 및 아피주
4	ComRABVR	AAGGGGCTGTCTCGAAAT	Reverse	H	ERA 및 아피주

디자인된 프라이머는 상업적으로 제작처를 통해 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)로 제작하였다(Bioneer cooperation, 대한민국).

상기 표 1의 프라이머로 multiplex RT-PCR을 수행함으로써 광견병 아피바이러스와 ERAG5 균주를 구별하여 검출할 수 있는지를 평가하였다. 실험과정(도 10 참조)은 간단히 설명하면, 우선 실험에 사용된 광견병 바이러스는 RNeasy mini kit(QIAGEN)를 사용하여 RNA 추출하였고, One-step RT-PCR을 위해 one-step RT-PCR kit(QIAGEN)를 준비하였다. multiplex-RT-PCR을 위하여 Qiagen사의 one-step RT-PCR kit의 시약에 상기 표 1의 전방향 및 역방향 프라이머 4종(ERAG5F, ERAG5R, ComRABVF, ComRABVR)을 각각 50 pM, RNA 5 µL, DEPC-water 13 µL, 5X buffer 10 µL, dNTP 0.5 µL, enzyme mix 0.5 µL을 넣어 총 25 µL의 mix를 만든다. 만들어진 mix를 원심한 후 PCR 장비(GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem)에 넣고 42°C 15분, 95°C 3분, 30cycle의 PCR (95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초), 72°C 5분, 4°C 10분까지 조건으로 하여 반응시킨 후 1.8% agarose gel에 전기영동하여 증폭된 유전자 밴드를 확인하였다.

그림 42. 광견병 바이러스 검출법 관련 선행기술 #1

7. 유전자검사

7-1. 유전자 검사(RT-PCR)

▣ 개요

뇌 조직으로부터 광견병 바이러스 유전자를 검출하는 매우 민감한 검사법이다. 조직 내에 광견병 바이러스가 소량만 존재하여도 검출이 가능하다는 장점이 있는 반면에 작은 오염이 있을 경우에도 거짓 양성(위양성) 반응을 보일 수 있는 단점이 있다.

▣ 검사시료

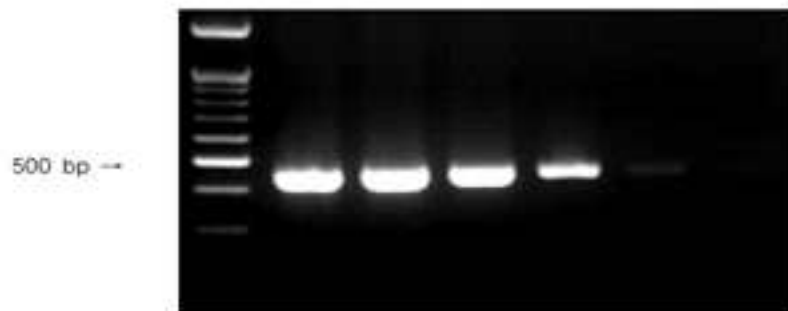
- 1) 뇌조직을 조직배양배지나 PBS에 10%로 부유하여 유제한 다음 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 그 상청액을 수거한다.
- 2) 상청액으로부터 RNA를 추출한다(시중에 판매중인 RNA extraction kit 사용)
- 3) 프라이머(reverse primer), 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한다.
- 4) cDNA를 증합효소, 특이 primer 및 완충액 등과 혼합하여 적정 온도 조건 하에서 PCR을 실시한다.

▣ Primer 및 RT-PCR 조건

Target gene	Primer sequences	Product size
N gene	RVNSF : 5'-GCA GAT AGG ATA GAG CAR A-3' RVNSR : 5'-AAA GTG AAT GAG ATT GAA C-3'	467 bp
RT	50°C(45°C), 30min : 95°C, 15min	
PCR	95°C, 3min, 35 cycles(94°C, 30sec, 55°C, 30sec, 72°C, 30sec) : 72 °C, 10 min	

▣ 결과판정

- 1) Agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr)로 염색한 후 증폭 밴드를 확인한다.



▣ 유의사항

- 1) 항상 양성 및 음성 대조군을 함께 실험하여야 하며, filter tip을 항상 사용 하고 일단 tip이나 튜브가 다른 시약에 접촉하였을 경우 즉시 교체하여야 한다.
- 2) 반드시 실험자는 실험용 장갑을 착용하고 실험을 실시한다.

그림 43. 광견병 바이러스 검출법 관련 선행기술 #2

ERAGS 백신주 시료를 10^4 copies/ μ l 부터 10^0 copy/ μ l까지 10배씩 희석하여 사용함. 비교 평가 결과 과제를 통해 개발된 실시간 유전자 증폭법 기반 진단법은 10^1 copies/ μ l까지 복수의 타겟을 동시에 검출할 수 있는데 반해 복수의 타겟을 동시에

검출할 수 있는 선행기술 1의 경우 10^3 copies/ μ l 까지, 단일로 검출할 수 있는 선행기술 2의 경우 10^1 copies/ μ l까지 검출할 수 있음을 확인하함. 이를 통해 본 과제를 통해 개발된 광견병 바이러스 진단법이 기존에 사용되고 있는 진단법에 비해 우수하다는 것을 확인함. (그림 44~45)

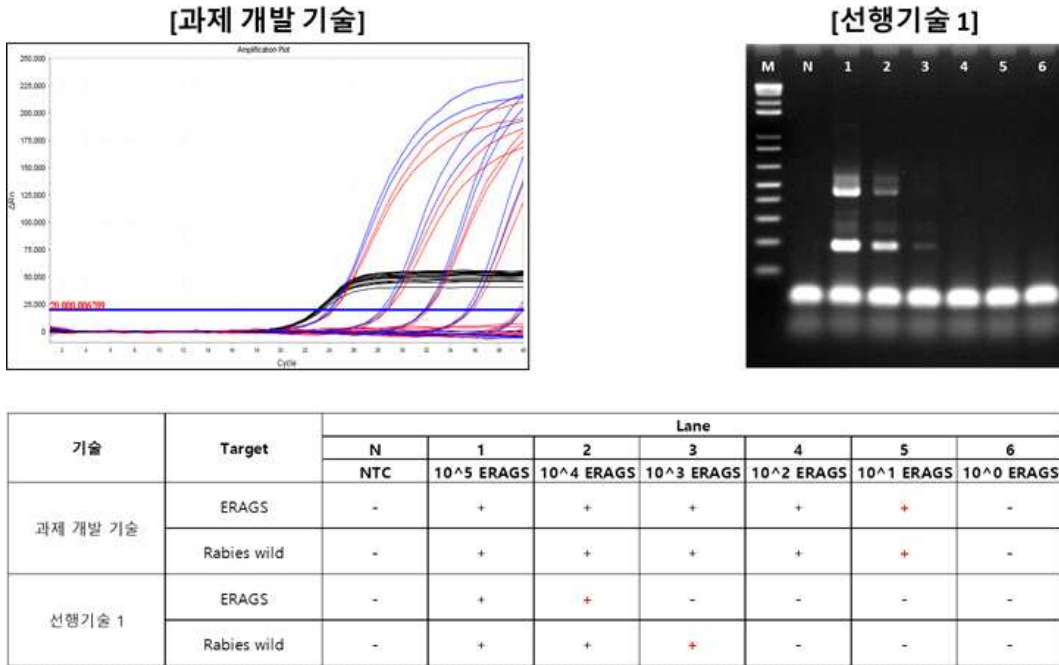
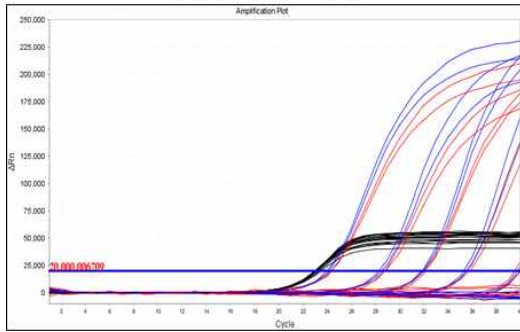


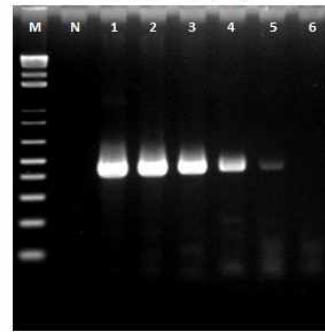
그림 44. 실시간 유전자 증폭기법 기반 과제개발기술과 선행기술1의 비교

과제개발기술은 ERAGS 및 rabies wild 모두 10^1 copies/ μ l까지 검출되고 선행기술 1의 경우 ERAGS는 10^4 copies/ μ l, rabies wild 는 10^3 copies/ μ l까지 검출되는 것을 확인함.

[과제 개발 기술]



[선행기술 2]

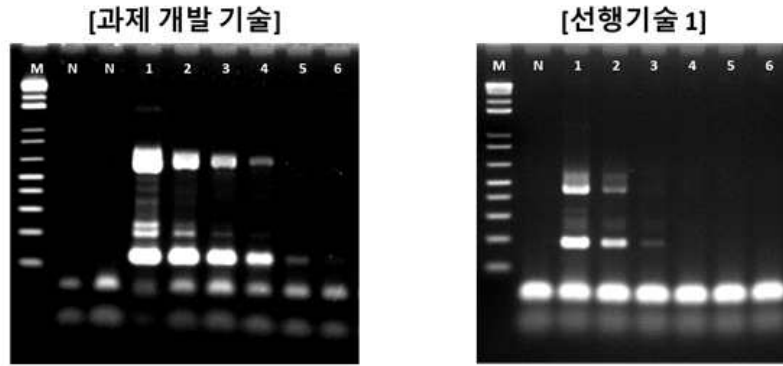


기술	Target	Lane						
		N	1	2	3	4	5	6
		NTC	10 ⁵ ERAGS	10 ⁴ ERAGS	10 ³ ERAGS	10 ² ERAGS	10 ¹ ERAGS	10 ⁰ ERAGS
과제 개발 기술	ERAGS	-	+	+	+	+	+	-
	Rabies wild	-	+	+	+	+	+	-
선행기술 2	Rabies wild	-	+	+	+	+	+	-

그림 45. 실시간 유전자 증폭기법 기반 과제개발기술과 선행기술2의 비교

과제개발기술은 ERAGS 및 rabies wild 모두 10¹ copies/ μ l까지 검출되고 선행기술 2의 경우 rabies wild 는 10¹ copies/ μ l까지 검출되는 것을 확인함.

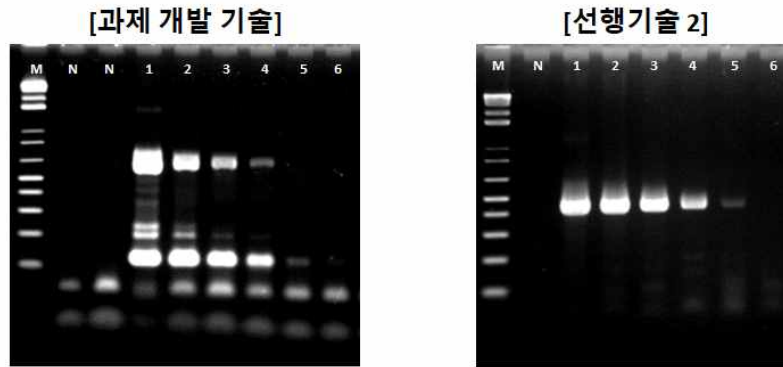
ERAGS 백신주 시료를 10⁴ copies/ μ l 부터 10⁰ copy/ μ l까지 10배씩 희석하여 사용함. 비교 평가 결과 과제를 통해 개발된 유전자 증폭법 기반 진단법은 ERAGS는 10¹ copies/ μ l, rabies wild는 10¹ copies/ μ l까지 복수의 타겟을 동시에 검출할 수 있는데 반해 복수의 타겟을 동시에 검출할 수 있는 선행기술 1의 경우 10³ copies/ μ l 까지, rabies wild만 단일로 검출할 수 있는 선행기술 2의 경우 10¹ copies/ μ l까지 검출할 수 있음을 확인함. 이를 통해 본 과제를 통해 개발된 광견병 바이러스 진단법이 기존에 사용되고 있는 진단법에 비해 우수하다는 것을 확인함. (그림 46~47)



기술	Target	Lane						
		N	1	2	3	4	5	6
		NTC	10 ⁵ ERAGS	10 ⁴ ERAGS	10 ³ ERAGS	10 ² ERAGS	10 ¹ ERAGS	10 ⁰ ERAGS
과제 개발 기술	ERAGS	-	+	+	+	+	-	-
	Rabies wild	-	+	+	+	+	+	-
선행기술 1	ERAGS	-	+	+	-	-	-	-
	Rabies wild	-	+	+	+	-	-	-

그림 46. 유전자 증폭기법 기반 과제개발기술과 선행기술1의 비교

과제개발기술은 ERAGS는 10¹ copies/ μ l, rabies wild는 10¹ copies/ μ l까지 검출되고 선행기술 1의 경우 ERAGS는 10⁴ copies/ μ l, rabies wild 는 10³ copies/ μ l까지 검출되는 것을 확인함.



기술	Target	Lane						
		N	1	2	3	4	5	6
		NTC	10 ⁵ ERAGS	10 ⁴ ERAGS	10 ³ ERAGS	10 ² ERAGS	10 ¹ ERAGS	10 ⁰ ERAGS
과제 개발 기술	ERAGS	-	+	+	+	+	-	-
	Rabies wild	-	+	+	+	+	+	-
선행기술 2	Rabies wild	-	+	+	+	+	+	-

그림 47. 유전자 증폭기법 기반 과제개발기술과 선행기술2의 비교

과제개발기술은 ERAGS는 10¹ copies/ μ l, rabies wild는 10¹ copies/ μ l까지 검출되고 선행기술 2의 경우 rabies wild 는 10¹ copies/ μ l까지 검출되는 것을 확인함.

라) 기존 시판 제품과의 비교

현재 시판되는 제품 중 본 과제를 통해 개발된 제품과 동일한 구성의 제품은 없으나 이와 유사한 형태의 제품에 대한 비교 평가를 진행하여 추후 추적 평가 시 제출할 예정입니다.

2-2. 제1협동연구기관: 강원대학교

1차년도 연구성과

가. 광견병 미끼백신 살포지역에서 서식하고 있는 야생동물(너구리)의 항체모니터링

제1협동연구기관인 강원대학교는 광견병 미끼백신 살포지역에서 서식하고 있는 야생동물의 항체모니터링을 위해 야생동물의 포획과 포획된 너구리에서의 광견병 혈청검사 및 분석을 수행함.

강원 및 경기 지역에 서식하는 광견병 전파가 가능한 너구리 및 기타 야생동물은 강원대학교 야생동물구조센터에서 포획하여 광견병 혈청검사를 수행하였고 경기 지역에서의 야생동물 포획은 경기도 야생동물구조센터의 협력을 통해 수행함. 현재 강원도 야생동물구조센터에서 보유중인 시료의 현황은 표 20과 같음.

표 20. 강원도 야생동물구조센터 시료 현황

구분	종	혈청	폐사체
강원	너구리	39	36
	개	40	
	고양이	7	
	오소리	2	
경기	너구리	18	26
계		106	62

너구리 포획 수량이 예상만큼의 이루어지지 않았으나 너구리와 같이 야생에서 광견병을 전달할 수 있는 다른 야생동물(개, 고양이, 오소리 등)을 이용하여 광견병을 전파시킬 수 있는 야생동물에서의 임상시험을 수행함.

포획 및 구조된 야생동물은 개체 식별을 위한 microchip삽입 후 신체계측 및 혈액검사를 수행. (그림 48~50)



그림 48. 포획 및 구조에 사용되는 도구(포획틀, 목집게, 컨트롤 폴, 뜰채) 및 개체 식별을 위한 microchip 삽입 관련 도구

✓ 포유류 측정치 기록 방법(너구리)

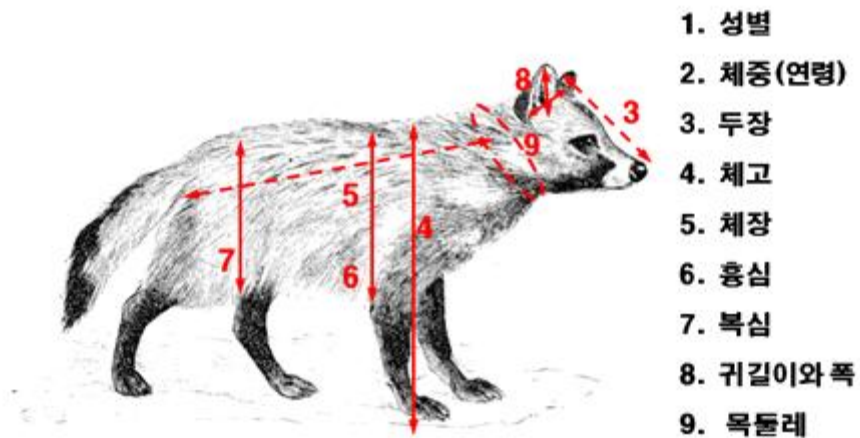


그림 49. 포유류 측정치 기록 방법(너구리)

*두장(Skull length): 두정사이골 바깥후두융기 ~ 코 끝 직선거리, 체고 (withers height): 견갑부 정점(T3~5) ~ 지면수직거리, 체장(body length): 견단(견갑골 관절위 결절) ~ 좌골단 직선거리, 흉심(chest length): 견갑골 뒤쪽각 상단에서 가슴 하면 수직거리, 복심(abdomen length): 골반 장골앞등쪽가시 직전 ~ 복부하면까지 수직거리, 귀길이: 귀 기시부에서 귀끝까지의 직선거리, 목둘레: 목의 가장 가는 부위



그림 50. 포획한 너구리의 신체계측 및 혈액검사 과정

너구리 및 기타 다른 동물에서의 신체계측 및 혈액검사 결과는 다음과 같음.

표 21. 강원도 야생동물구조센터 너구리 신체계측표 - 39 개체

No.	개체 번호	두장 (cm)	체고 (cm)	체장 (cm)	흉심 (cm)	복심 (cm)	체중 (kg)
1	5-930	14	25	38	12	13	4.8
2	5-980	13	27	32	12	12	5.09
3	5-1037	13	30	36	12	13	6.5
4	5-1076	12	25	29	11	13	5.2
5	6-022	13	25	25	12	12	4.5
6	6-97	12	24	26	12	12	4.4
7	6-154	12.5	26	24	11	11	5.9
8	6-229	11	27	33	11	12	4.8
9	6-638	11	26	42	15	12	4.4
10	6-639	12	23	35	12	10	2.7
11	6-641	12	24	35	13	10	2.8
12	6-480	12	22	20	12	11	3.7
13	6-668	14	26	38	14	13	4.5

14	6-481	12	22	20	12	11	3.8
15	6-600	12	23	32	13	12	2.2
16	6-642	12	20	35	12	10	3.1
17	6-598	12	24	33	11	10	2.5
18	6-518	12	28	40	13	13	3.5
19	6-640	12	24	35	11	11	2.26
20	6-895	13	25	40	11	10	3.8
21	6-818	12	24	41	10	10	4
22	6-854	13	21	31	12	11	3.5
23	6-902	10	24	31	11	13	3.8
24	6-916	13.5	23.5	40	13	16	5.2
25	6-921	13	25	48	14	13	4.8
26	6-943	13	22	33	13	12	5.1
27	6-971	11	18	24	10	9	2.2
28	6-983	13	17	30	12	12	4.6
29	6-156	16	11	32	7	6	5
30	6-1012	9	21	38	13	11	3.9
31	7-49	10	20	35	12	10	4.2
32	7-51	11	18	27	11	9	3.8
33	7-59	10	19	26	10	8.5	3.4
34	7-61	12	19	27	12	10	3.7
35	7-85	13	18	31	11	11	4.1
36	7-111	12	17.5	30	12	10	4.3
37	7-121	11	18	29	13	12	4
38	7-124	13	19.5	31	13	12	4.5
39	7-125	11	18	28	12	11	3.6

두장(Skull length): 두정사이골 바깥후두용기 ~ 코 끝 직선거리, 체고(withers height): 견갑부 정점(T3~5) ~ 지면수직거리, 체장(body length): 견단(견갑골 관절위 결절) ~ 좌골단 직선거리, 흉심(chest length): 견갑골 뒤쪽 각 상단에서 가슴 하면 수직거리, 복심(abdomen length): 골반 장골앞등쪽가시 직전 ~ 복부하면까지 수직거리, 귀 길이: 귀 기시부에서 귀끝까지의 직선거리, 목둘레: 목의 가장 가는 부위

강원도 야생동물구조센터 너구리의 신체계측 결과 평균값은 두장 12.13 cm, 체고 22.29 cm, 체장 32.31 cm, 흉심 11.87 cm, 복심 11.21 cm, 체중 4.06 kg 임.

표 22. 강원도 야생동물구조센터 너구리 신체검사(vital) - 30 개체

너구리	개체번호	Microchip ID	VITAL			
			BT (°C)	HR (count/min)	RR (count/min)	SBP (mmHg)
1	5-930	0007153064	39.3	60	32	106
2	5-980	0007156EEF	38.8	124	28	103
3	5-1037	00071567CD	39.2	108	40	110
4	5-1076	00071516E8	38.2	88	24	103

5	6-22	0007153C47	39	144	24	108
6	6-97	0007153F4F	38.5	120	40	105
7	6-154	0007153F34	37.9	80	20	110
8	6-229	00071507C1	38.7	120	22	110
9	6-638	000715395D	38.3	172	40	115
10	6-639	000715142A	41.0	180	90	110
11	6-641	000715202F	38.3	172	40	110
12	6-480	0007155F87	39.2	138	30	120
13	6-668	0007156608	39.3	156	60	110
14	6-481	000715C9A8	39.2	162	42	100
15	6-600	0007157469	40.2	174	36	107
16	6-642	000715375C	38.6	138	30	105
17	6-598	0007152B55	41.0	144	45	103
18	6-518	000715192D	37.8	158	42	110
19	6-640	00071531D6	37.7	142	44	108
20	6-895	0007153F5F	37.3	120	30	110
21	6-818	-	38.1	108	40	105
22	6-854	-	38.7	96	24	90
23	6-902	-	37.4	146	44	116
24	6-916	-	38.5	132	40	112
25	6-921	-	39.0	124	36	110
26	6-943	-	37.5	112	28	100
27	6-971	00071564B1	37.9	96	28	102
28	6-983	-	37.1	92	26	105
29	6-156	0007156BFE	38.2	108	30	100
30	6-1012	-	36.9	80	24	90

BT; body temperature, HR; heart rate, RR; respiratory rate, SBP; systolic blood pressure

강원도 야생동물구조센터 너구리의 vital 측정결과 평균값(30개체)은 체온 38.7 °C, HR 105.5 count/min, RR 28.75 count/min, SBP 106.88 mmHg임.

표 23. 강원도 야생동물구조센터 너구리 혈액검사(procyte, catalyst) 결과 - 39개체

너구리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC (K/ μ L)	RBC (M/ μ L)	HCT (%)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7-27	0.5-1.8	10-125	0-50	5.2-8.2	2.3-4.0
1	5-930	13.92	4.53	27.9	38	1.2	40	158	8.3	2.6
2	5-980	17.92	5.12	27.4	16	0.4	28	43	6.9	2.3
3	5-1037	17.73	5.00	28.6	13	0.5	71	112	8.6	2.9
4	5-1076	19.73	6.88	35.6	3	0.3	39	40	6.4	2.5
5	6-22	11.33	4.00	25.0	15	0.5	86	124	8.1	2.6

6	6-97	23.10	5.59	29.0	9	0.3	37	78	6.0	1.9
7	6-154	13.69	4.23	25.1	24	1.2	153	184	>12.0	2.5
8	6-229	20.61	6.78	38.7	8	0.5	23	53	8.3	2.0
9	6-638	11.12	7.62	42.2	16	0.7	21	68	6.2	3.2
10	6-639	11.96	5.75	34.4	10	0.7	57	110	6.5	3.2
11	6-641	9.61	6.79	41.2	15	0.6	29	35	6.3	3.4
12	6-480	10.55	6.79	41.8	16	0.6	23	43	6.3	3.4
13	6-668	10.80	7.54	47.5	13	0.5	70	43	6.4	3.8
14	6-481	12.19	6.61	40.5	14	0.7	39	74	6.5	3.3
15	6-600	8.90	5.84	37.7	28	0.8	28	60	6.6	3.2
16	6-642	12.21	6.48	39.8	13	0.5	94	50	6.1	3.2
17	6-598	9.09	6.49	41.6	33	0.6	32	69	6.7	3.5
18	6-518	13.82	7.13	46.9	4	0.5	61	.	7.6	2.0
19	6-640	12.64	5.46	30.8	14	0.3	19	31	5.6	2.8
20	6-895	9.03	4.87	29.4	13	0.5	30	68	7.3	2.6
21	6-818	11.87	4.40	27.3	61	.	531	.	6.9	3.4
22	6-854	11.27	5.42	33.3	36	0.4	125	61	7.9	2.6
23	6-902	16.35	4.45	25.0	18	0.4	75	98	7.6	2.5
24	6-916	13.72	6.74	47.1	65	0.7	740	3794	6.1	2.8
25	6-921	7.47	2.72	15.4	14	0.3	163	97	5.5	2.3
26	6-943	18.59	5.86	36.2	24	0.4	134	72	6.4	2.5
27	6-971	31.29	3.90	23.4	19	0.3	18	89	7.1	2.2
28	6-983	31.68	3.72	24.4	41	0.2	65	115	7.4	2.6
29	6-156	22.08	6.57	39.0	38	0.6	68	146	8.0	3.2
30	6-1012	14.61	6.34	39.1	34	0.2	38	46	6.5	2.5
31	7-49	16.41	3.92	20.0	9	0.2	100	47	5.3	2.0
32	7-51	24.73	4.78	26.2	34	0.1	94	85	6.0	2.2
33	7-59	19.07	2.27	14.0	23	<0.1	21	62	4.2	1.6
34	7-61	44.14	2.21	13.5	43	0.2	51	58	6.3	2.2
35	7-85	18.04	5.68	39.6	54	0.9	464	296	8.4	3.0
36	7-111	15.71	3.09	18.1	111	0.1	61	43	4.6	1.9
37	7-121	16.32	7.84	48.7	17	0.7	74	73	7.6	3.0
38	7-124	4.23	11.15	67.7	79	.	144	.	3.7	1.5
39	7-125	25.58	4.47	25.6	31	0.6	204	268	6.5	2.8

WBC=white blood cell, RBC=red blood cell, HCT hematocrit, BUN=blood urea nitrogen, CREA=creatinine, ALT=alanine aminotransferase, AST=aspartate aminotransferase, TP=total protein, ALB=albumin

강원도 야생동물구조센터 너구리의 혈액검사 결과 평균값(39개체)은 WBC 14.96 K/ μ l, RBC 5.65M/ μ l, HCT 34.0 %, BUN 22 mg/dl, ALT 98 U/l, AST 213 U/l, TP 6.9 g/dl, ALB 2.8 g/dl 임.

표 24. 경기도 야생동물구조센터 너구리 신체계측표 - 18개체

No.	개체 번호	두장	체고	체장	흉심	복심	체중
-----	-------	----	----	----	----	----	----

		(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(kg)
1	GG1	9	16	28	11	10	3.2
2	GG2	11	16	23	12	12	4.1
3	GG3	10	18	26	10	9	2.7
4	GG4	11	21	28	11	12	3.1
5	GG5	9	21	29	11	10	2.7
6	GG6	12	20	31	13	12	4.3
7	GG7	12	20	31	13	12	3.9
8	GG8	9	18	27	11	10	2.4
9	GG9	10	20	27	11	10	3
10	GG10	13	21	31	12	11	3.9
11	GG11	12	20	29	11	10	4
12	GG12	11	18	27	10	9	3.7
13	GG13	12	18.5	30	12	11	3.9
14	GG14	13	19	31	12	11.5	4.1
15	GG15	10	18	27	9	8	3.7
16	GG16	9	16	25	8.5	7	2.8
17	GG17	11	18	28	10	9	3
18	GG18	12	19	28	11	10	3.6

두장(Skull length): 두정사이골 마갈후두용기 ~ 코 끝 직선거리, 체고(withers height): 견갑부 정점(T3~5) ~ 지면수직 거리, 체장(body length): 견단(견갑골 관절위 결절) ~ 좌골단 직선거리, 흉심(chest length): 견갑골 뒤쪽각 상단에서 가슴 하면 수직거리, 복심(abdomen length): 골반 장골앞등쪽가시 직전 ~ 복부하면까지 수직거리, 귀길이: 귀 기서부에서 귀끝까지의 직선거리, 목둘레: 목의 가장 가는 부위

경기도 야생동물구조센터 너구리의 신체계측 결과 평균값(18개체)은 두장 10.89 cm, 체고 18.75 cm, 체장 28.11 cm, 흉심 11.03 cm, 복심 10.19 cm, 체중 3.45 kg임.

표 25. 경기도 야생동물구조센터 너구리 신체검사(vital) - 10개체

너구리	개체번호	VITAL			
		BT (°C)	HR (count/min)	RR (count/min)	SBP (mmHg)
1	경기 1	38.7	80	24	98
2	경기 2	39.2	94	30	100
3	경기 3	38.4	79	18	90
4	경기 4	36.9	102	36	120
5	경기 5	37.8	85	24	95

6	경기 6	38.2	92	28	98
7	경기 7	37.3	66	12	86
8	경기 8	39.1	88	26	102
9	경기 9	38.6	96	32	105
10	경기 10	37.9	100	34	114

BT; body temperature, HR; heart rate, RR; respiratory rate, SBP; systolic blood pressure

경기도 야생동물구조센터 너구리의 vital 측정결과 평균값(10개체)은 BT 38.21 °C; HR 88.2 count/min; RR 26.4 count/min; SBP 100.8 mmHg 임.

표 26. 경기도 야생동물구조센터 너구리 혈액검사(procyte, catalyst) 결과 - 18개체

너구리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC (K/ μ L)	RBC (M/ μ L)	HCT (%)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7-27	0.5-1.8	10-125	0-50	5.2-8.2	2.3-4.0
1	GG1	16.97	3.46	21.4	23	0.7	167	67	7.8	2.7
2	GG2	27.29	6.32	40.8	44	0.3	23	78	8.5	2.5
3	GG3	17.05	6.57	39.8	53	0.3	84	58	7.4	2.8
4	GG4	20.62	5.10	29.9	38	0.3	88	89	7.6	2.5
5	GG5	6.79	6.26	38.9	17	0.3	126	70	6.3	2.2
6	GG6	18.87	4.01	23.3	38	0.3	70	80	7.6	2.6
7	GG7	7.98	8.13	47.6	12	0.7	47	49	7.0	3.1
8	GG8	22.99	5.60	31.1	33	0.1	120	123	7.2	2.2
9	GG9	35.51	4.66	29.5	35	0.3	158	119	7.1	2.6
10	GG10	31.20	4.24	22.8	37	0.2	49	80	7.6	2.3
11	GG11	24.22	6.47	37.1	34	0.5	95	74	6.9	3.1
12	GG12	25.46	6.86	38.9	40	0.5	54	60	6.5	2.7
13	GG13	35.31	8.46	45.3	26	0.9	62	87	7.3	2.9
14	GG14	20.12	5.50	27.8	31	0.4	222	134	7	2.8
15	GG15	21.55	8.10	43.3	14	0.7	235	522	6.9	3.4
16	GG16	14.06	6.00	35.6	33	0.4	33	80	7.2	2.6
17	GG17	29.25	4.15	25.3	30	0.3	27	65	7.4	2.6
18	GG18	29.59	5.69	27.5	48	0.3	74	91	6.2	2.3

WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin

경기도 야생동물구조센터 너구리의 혈액검사 결과 평균값(39개체)은 WBC 14.96 K/ μ l, RBC 5.65M/ μ l, HCT 34.0 %, BUN 22 mg/dl, ALT 98 U/l, AST 213 U/l, TP 6.9 g/dl, ALB 2.8 g/dl임.

표 27. 강원도 내 기타 동물 혈액검사(procyte, catalyst) 결과 - 43개체(개 40개체, 고양이 1개체, 오소리 2개체)

개	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC (K/ μ L)	RBC (M/ μ L)	HCT (%)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7-27	0.5-1.8	10-125	0-50	5.2-8.2	2.3-4.0
1	D1	9.59	6.93	47.1	20	1.0	53	39	6.1	2.9
2	D2	9.61	7.06	45.7	18	1.0	44	35	6.3	3.0
3	D3	8.46	6.65	44.1	22	0.8	54	40	6.2	3.1
4	D4	9.03	6.77	42.9	14	0.8	40	38	6.0	2.9
5	D5	7.17	6.69	46.5	14	0.8	54	34	6.6	3.2
6	D6	7.84	5.69	37.4	11	.	48	.	5.6	2.6
7	D7	6.45	7.33	47.9	28	0.7	84	.	6.1	3.0
8	D8	8.51	7.00	46.6	14	0.7	118	29	6.9	3.1
9	D9	8.88	6.93	47.0	19	0.8	57	52	7.0	3.6
10	D10	10.22	7.80	53.6	20	0.7	74	41	5.9	3.1
11	D11	5.58	4.36	29.2	12	0.7	47	43	6.4	2.7
12	D12	18.27	6.02	39.3	9	0.6	78	37	6.8	2.7
13	D13	7.87	4.37	25.8	16	0.7	48	52	7.2	2.9
14	D14	13.08	8.76	57.1	17	1.0	64	48	6.1	3.1
15	D15	9.64	5.58	34.0	13	0.7	45	33	6.5	2.9
16	D16	21.33	4.28	27.3	16	0.7	59	80	7.3	2.3
17	D17	16.26	7.52	48.1	10	0.6	59	40	6.8	2.8
18	D18	14.59	5.21	34.8	9	0.7	151	120	7.6	2.8
19	D19	18.52	6.02	45.7	17	1.1	14	36	6.4	2.8
20	D20	15.73	6.00	37.3	22	0.8	.	649	7.2	2.7
21	D21	.	2.18	15.5	18	0.9	57	46	6.0	3.1
22	D22	20.72	7.68	48.3	21	0.8	111	70	7.6	3.6
23	D23	15.79	7.64	52.7	13	1.0	42	60	7.3	3.1
24	D24	13.89	5.26	33.7	20	0.5	88	72	5.6	2.5
25	D25	6.52	7.24	47.0	14	0.6	83	43	7.0	3.2
26	D26	15.80	7.17	43.6	15	0.8	34	51	6.1	3.1
27	D27	25.49	7.26	43.7	20	0.9	68	37	6.1	2.6
28	D28	13.78	7.57	45.5	12	0.8	47	32	6.2	2.8
29	D29	18.04	5.71	39.0	13	0.7	64	50	5.9	2.7
30	D30	25.02	8.00	49.7	11	0.8	35	41	6.5	3.0
31	D31	13.68	8.29	54.2	7	1.0	202	67	7.2	3.4
32	D32	7.90	4.27	27.5	17	1.0	46	330	6.8	2.8

33	D33	9.76	7.28	46.5	13	0.8	434	52	6.6	3.0
34	D34	9.32	7.66	45.9	25	1.0	74	41	7.8	3.4
35	D35	6.39	6.88	40.7	15	1.0	104	79	6.1	2.7
36	D36	5.80	5.23	38.9	14	0.8	103	71	6.4	3.4
37	D37	7.46	8.86	44.7	12	1.0	55	38	6.0	2.6
38	D38	9.87	6.78	38.5	15	1.0	67	.	6.3	2.9
39	D39	10.02	5.81	37.6	11	0.7	116	50	5.6	2.7
40	D40	12.33	6.67	39.1	14	0.7	47	43	5.6	2.3

오소리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC (K/ μ L)	RBC (M/ μ L)	HCT (%)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
	Reference range (BADGER)	2.00-10.00	6.35-11.20	37.0-55.0	10-45	0.4-0.9	82-289	28-120	5.2-7.3	2.6-3.8
1	7-298	7.03	12.13	49.9	14	0.8	31	67	6.9	3.3
2	7-299	7.83	11.20	43.7	23	0.6	40	81	7.2	2.7

코양이	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC (K/ μ L)	RBC (M/ μ L)	HCT (%)	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
	Reference range (CAT)	2.87-17.02	6.54-12.20	30.3-52.3	16-36	0.8-2.4	12-130	0-48	5.7-8.9	2.2-4.0
1	C1	20.42	10.69	43.2	21	<0.1	44	0	8.1	2.5

WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin

강원도 내 유기견의 혈액검사 결과 평균값(40개체). WBC 13.16 K/ML; RBC 6.42 M/ML; HCT 41.9 %; BUN 16 mg/dL; CREA 0.8 mg/dL; ALT 63 U/L; AST 70 U/L; TP 6.5 g/dL; ALB 2.9 g/dL이고 강원도 내 오소리의 혈액검사 결과 평균값(2개체). WBC 7.43 K/ML; RBC 11.67 M/ML; HCT 46.8 %; BUN 18.5 mg/dL; CREA 0.7 mg/dL; ALT 35.5 U/L; AST 74 U/L; TP 7.05 g/dL; ALB 3 g/dL 임.

강원도 및 경기도내 야생 너구리 폐사체는 총 62개체가 확인되었고 대부분의 경우 기생충 감염에 의해 폐사한 것을 확인함. (표 28~29)

표 28. 강원도 야생동물구조센터 너구리 폐사체 정보 - 36개체

너구리	개체번호	결과일자	구조 결과	발견 장소	발생 원인
1	6-818	160901	DOA	강원 평창군 벼은 계곡(산)	자연적 사고
2	6-824	160905	안락사	강원 춘천시 춘천 IC(도로)	차량과의 충돌
3	6-856	160916	폐사체	강원 춘천시 동산면 봉명리(농지)	기생충 중감염
4	6-876	160928	DOA	강원 춘천시 호반 영농조합(주책가)	기생충 중감염
5	6-902	161124	폐사	강원 강릉시 홍제동(주책가)	차량과의 충돌
6	6-904	161009	폐사체	강원 춘천시 샘밭 호반운수(도로)	차량과의 충돌
7	6-916	161014	안락사	강원 철원군 동송읍 강산리 639(농지)	기생충 중감염
8	6-921	161018	안락사	강원 동해시 시청 동물보호소(도로)	알 수 없는 이상

9	6-928	161021	안락사	강원 강릉시 언곡면(산)	뒹
10	6-938	161027	폐사	강원 동해시 동해시청(주택가)	뒹
11	6-947	161029	DOA	강원 춘천시 남면 발산리 44 번지(산)	기생충 중감염
12	6-951	161102	DOA	강원 춘천시 북산면(도로)	기아 및 탈진
13	6-972	161115	DOA	강원 양구군 남면 한강리(도로)	기생충 중감염
14	6-983	161130	폐사	강원 양구군(도로)	기생충 중감염
15	6-994	161210	DOA	강원 춘천시 동내면 사암리 586-3(주택가)	기생충 중감염
16	7-002	170108	폐사	강원 양구군 박수근 미술관 부근(도로)	기생충 중감염
17	7-018	170119	폐사체	강원 철원 화지리 문화복지센터 옆 수로(주택가)	기생충 중감염
18	7-025	170131	폐사	강원 횡성군(주택가)	기생충 중감염
19	7-051	170228	폐사	춘천 한림대학교 과학연구원 잔디밭	기생충 중감염
20	7-061	170306	폐사	춘천 상중도내 강변	기생충 중감염
21	7-072	170325	폐사	평창 평창읍 중부리	기생충 중감염
22	7-077	170327	폐사	춘천 사농동 377	기생충 중감염
23	철원 1	130822	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	차량과의 충돌
24	철원 2	130923	폐사체	철원군 동송읍 오덕리	기생충 중감염
25	철원 3	131122	폐사체	철원군 서면 자등리	기생충 중감염
26	철원 4	131206	폐사체	철원군 동송읍 오덕리	기생충 중감염
27	철원 5	131213	폐사체	철원군 서면 자등리	기생충 중감염
28	철원 6	131215	폐사체	철원군 서면 와수리	기생충 중감염
29	철원 7	131216	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	기생충 중감염
30	철원 8	140109	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	기생충 중감염
31	철원 9	140207	폐사체	철원군 철원읍 화지리	기생충 중감염
32	철원 10	140221	폐사체	철원군 갈말읍 지포리	기생충 중감염
33	철원 11	140323	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	차량과의 충돌
34	철원 12	150122	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	기생충 중감염
35	철원 13	150220	폐사체	철원군 동송읍 장흥리	기생충 중감염
36	철원 14	151225	폐사체	철원군 동송읍 오지리	기생충 중감염

강원도 내 너구리 폐사체의 사고 발생 원인(36개체). 기생충 중감염 72.2 % (26개체); 차량과의 충돌 13.9 % (5개체); 뒹 5.5 % (2개체); 기아 및 탈진 2.8 % (1개체); 알 수 없는 외상 2.8 % (1개체); 자연적 사고 2.8 % (1개체)

표 29. 경기도 야생동물구조센터 너구리 폐사체 정보 - 26개체

너구리	개체번호	결과일자	구조 결과	발견 장소	발생 원인
1	2016-0849	160803	안락사	경기 광명시 소하동 (건물옆)	기아 및 탈진
2	2016-0961	161027	폐사	경기 수원시 장안구 정자동 873-5 (건물옆)	포식자 공격
3	2016-0974	161027	폐사	경기 화성시 매송면 야목리 (도로변)	기생충 중감염
4	2016-0982	161027	안락사	경기 광주시 곤지암읍 (도로변)	뒹
5	2016-1009	161027	폐사	경기 수원시 영통구 의의동 (도로변)	기생충 중감염
6	2016-1022	161027	폐사	경기 광명시 하안 2 동 692-2 (건물옆)	기생충 중감염
7	2016-1042	161027	폐사	경기 광명시 하안동 435 (건물옆)	기생충 중감염
8	2016-1044	161027	폐사	경기 용인시 처인구 유방동 (도로변)	차량과의 충돌
9	2016-1071	161031	안락사	경기 수원시 팔달구 인계동 (건물옆)	세균중감염(패혈증) 기생충 중감염
10	2016-1075	161101	안락사	경기 안산시 단원구 신길동 1679 아이파크 후문 (도로변)	기생충 중감염
11	2016-0863	161102	폐사	경기 광주시 곤지암읍 건업리 산(숲)	기생충 중감염
12	2016-0866	161102	폐사	경기 수원시 권선구 세류동(기타)	어미를 잃음
13	2016-0963	161103	폐사	경기 광명시 소하동(도로변)	차량과의 충돌
14	2016-1002	161103	폐사	경기 평택시 신장동(도로변)	기생충 중감염
15	2016-1008	161104	폐사	경기 화성시 매송면 야목리(건물옆)	기생충 중감염
16	2016-1032	161027	폐사	경기 광명시 하안동 435(건물옆)	기생충 중감염
17	2016-1033	161013	DOA	경기 광명시 철산동 367-1(도로변)	기생충 중감염

18	2016-1038	161014	DOA	경기 광명시 하안동 304(건물옆)	기생충 증감염
19	2016-1040	161017	DOA	경기 수원시 팔달구 인계동(도로변)	기생충 증감염
20	2016-1043	161018	DOA	경기 수원시 장안구 정자동(건물옆)	기생충 증감염
21	2016-1083	161102	DOA	경기 용인시 기흥구 보정동(건물옆)	기생충 증감염
22	2016-1085	161102	폐사	경기 평택시 지산동 631-3	기생충 증감염
23	2016-1091	161104	폐사	경기 평택시 서탄면 내천리 639	기생충 증감염
24	2016-1100	161108	폐사	경기 평택시 신장동 640-5	기생충 증감염
25	2016-1103	161109	폐사	경기 수원시 장안구 정자동 벽산아파트	기생충 증감염
26	2016-1107	161114	폐사	경기 성남시 분당구 이매동 136	기생충 증감염

경기도 내 너구리 폐사체의 사고 발생 원인(26개체). 기생충 증감염 77 % (20개체); 차량과의 충돌 7.8 % (2개체); 기아 및 탈진 3.8 % (1개체); 뒷 3.8 % (1개체); 포식자 공격 3.8 % (1개체); 어미를 잃음 3.8 % (1개체)

나. 야생너구리의 광견병 바이러스 백신 유효성평가

광견병 바이러스 백신의 유효성을 평가하기 위해 포획된 야생 너구리 중 광견병 바이러스 음성개체에 미끼백신을 투여함. 투여된 백신은 1차 ERAGS, Ad0910_G, VRG 백신주, 2차 ERAGS, VRG 백신주를 투여하였고 투여된 개체에서는 구강 면봉 및 채혈을 통해 광견병 바이러스 백신 유효성 평가를 위한 시료를 확보함. (표 30, 그림 51)

표 30. 광견병 바이러스 백신의 유효성 평가를 위한 미끼백신 투여 및 시료 채취 정보

회차	투여일	백신주	투여개체번호	시료 채취일	
				구강면봉	혈액
1 차	16.09.06	ERAGS	6-480	16.09.07 ~16.09.13	16.10.04
			6-481		
			6-668		
		Ad0910_G	6-638		
			6-639		
			6-641		
		VRG	6-598		
			6-600		
			6-642		
		Control	6-518		
			6-640		
		2차	17.06.13		
6-943					
6-671					
VRG	6-1012				
	7-49				
	7-59				
Control	6-895				



그림 51. 광견병 바이러스 백신의 유효성 평가를 위한 미기백신 투여 및 시료 채취

확보된 광견병 바이러스 유효성평가를 위한 시료는 실시간 유전자 증폭기법을 이용한 광견병 바이러스 진단법 검증을 위해 주관기관인 코젠바이오텍에 전달됨.

2차년도 연구성과

가. 광견병 미끼백신 살포지역에서 서식하고 있는 야생동물(너구리)의 항체모니터링

제1협동연구기관인 강원대학교는 광견병 미끼백신 살포지역에서 서식하고 있는 야생동물의 항체모니터링을 위해 야생동물의 포획과 포획된 너구리에서의 광견병 혈청검사 및 분석을 수행하였다.

강원 및 경기 지역에 서식하는 광견병 전파가 가능한 너구리 및 기타 야생동물은 강원대학교 야생동물구조센터에서 포획하여 광견병 혈청검사를 수행하였고 경기 지역에서의 야생동물 포획은 경기도 야생동물구조센터의 협력을 통해 수행하였다. 현재 강원도 야생동물구조센터에서 보유중인 시료의 현황은 표 31과 같다.

표 31. 강원도 야생동물구조센터 시료 현황

구분	종	혈청
강원 센터	너구리	53
	고양이	2
	오소리	3
	삵	5
	족제비	3
경기 센터	너구리	34
충북 센터	너구리	5
울산 센터	너구리	2
계		107

너구리 포획 수량이 예상만큼의 이루어지지 않았으나 너구리와 같이 야생에서 광견병을 전달할 수 있는 다른 야생동물(고양이, 오소리, 삵, 족제비 등)을 이용하여 광견병을 전파시킬 수 있는 야생동물에서의 임상시험을 수행하였다.

포획 및 구조된 야생동물은 개체 식별을 위한 microchip삽입 후 신체계측 및 혈액검사를 수행한다. (그림 52~53)



그림 52. 포획 및 구조에 사용되는 도구(포획틀, 목집게, 컨트롤 폴, 뜯채) 및 개체 식별을 위한 microchip 삽입 관련 도구



그림 53. 포획한 너구리의 신체계측 및 혈액검사 과정

너구리 및 기타 다른 동물에서의 신체계측 및 혈액검사 결과는 다음과 같다.

표 32. 강원도 야생동물구조센터 너구리 혈액검사(procyte, catalyst) 결과 - 53개체

너구리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	HCT	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7.0-27	0.5-1.8	5.2-8.2	2.3-4.0	10-125	0-50
1	7-275	14.54	9.68	53.8	35	1.3	8	2.8	93	62
2	7-339	12.64	6.76	36.2	11	0.7	6.5	2.4	43	54
3	7-340	6.35	5.71	32.7	10	.	7.1	2.8	26	.
4	7-440	13.93	3.39	20.3	>130	0.5	7.6	2.5	27	46
5	7-526	1.19	0.81	5	15	0.5	7.5	2.9	27	30
6	7-528	4.68	4.7	31.6	11	0.6	.	2.9	79	.
7	7-689	15.52	6.67	41.3	25	0.5	7.7	3	23	45
8	7-752	16.23	5.64	33.8	18	0.5	7.5	3.2	52	58
9	7-768	9.43	7.23	60.8	17	0.4	6.9	2.8	68	91
10	7-774	3.95	4.7	35.1	11	0.4	5.9	2.7	<10	42
11	7-872	0.07	0.08	0.4	78	0.3	4.9	1.6	70	.
12	7-895	3.8	7.17	41.7	79	.	6.9	2.8	581	.
13	7-954	7.5	3.64	20.5	18	0.5	7.5	2.5	21	56
14	7-966	20.77	6.88	40	70	0.2	5.1	1.5	24	75
15	7-974	37.27	6.04	32	11	0.5	7.3	2.6	14	29
16	7-975	10.66	3.4	20.7	96	.	8.3	2.9	576	.
17	7-979	5.65	2.9	19.1	99	.	7.9	2.9	576	956
18	7-988	13.79	8.07	56.2	15	0.6	8.5	2.7	48	.
19	7-989	.	11.97	59.2	79	.	4.7	1.3	175	>1083
20	7-999	4.68	4.7	31.6	>130	.	6.3	1.9	165	386
21	7-1005	3.67	0.74	4.6	38	0.2	4.5	1.3	64	108
22	7-1007	0.03	14.52	79.7	51	.	7.4	3.2	.	.
23	7-1009	0.83	3.22	19.3	92	0.2	5.3	1.7	126	147
24	7-1013	1.19	0.81	5	54	.	6.6	2.2	334	843
25	7-1016	0.47	0.97	5.9	89	0.1	6	1.6	43	56
26	7-1017	7.41	.	.	52	.	7.4	3.5	.	.
27	7-1030	12.69	6.73	42	12	0.4	7.7	2.6	72	80
28	7-1037	3.95	4.7	35.1	119	.	7.1	2.3	75	.
29	7-1061	8.32	3.72	28.4	112	.	6	1.8	216	506
30	7-1073	0.15	0.58	3.9	85	0.4	4.9	1.9	123	231
31	7-1096	37.27	6.04	32	30	0.2	6.9	1.9	56	60
32	8-1	28.21	6.52	40.1	48	1.3	8.8	3.4	341	238
33	8-12	49.44	1.44	14.9	86	.	>12.0	>6.0	295	536
34	8-27	2.36	2.76	16.7	45	2	6	2.4	35	976

35	8-38	0.73	2.08	11.5	28	.	5.4	2	101	166
36	8-41	4.09	2.28	10.8	17	.	8.5	5.5	.	.
37	8-81	18.33	7	42.6	36	0.9	7.4	3.2	31	98
38	8-95	18.1	8.67	48.1	29	0.5	8	3.5	35	100
39	8-97	13.22	8.9	51.1	22	0.8	7	2.7	95	111
40	8-107	0.49	0.74	4.9	>130	.	4.2	1.8	415	>1083
41	8-109	27.94	1.34	7.9	>130	1.2	8.3	2.4	58	109
42	8-122	9.64	6.14	32.7	13	0.4	9.8	2.3	97	136
43	8-133	15.19	6.37	34.9	27	0.6	8.3	3.2	55	72
44	8-153	1.24	2.68	17.2	40	0.4	6.3	1.9	114	212
45	8-159	.	.	.	38	2.1	5.6	2.2	772	106
46	8-392	22.23	7.46	56.4	28	0.7	8.9	2.8	73	122
47	8-409	26.42	5.21	37.9	12	0.62	8	2.8	54	69
48	GN1	.	.	.	23	0.6	7.8	3.3	31	37
49	GN2	.	.	.	37	0.8	9	3.8	87	82
50	8-188	21.56	1.29	13.5	125	.	5.8	1.6	114	285
51	8-479	4.31	2.04	17.2
52	8-501	4.42	3.73	26.8	57	2.1	3.8	1.3	231	53
53	8-530	5.36	2.68	9.6

*WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin

*강원도 야생동물구조센터 너구리의 혈액검사 결과 평균값(53개체). WBC 11.26 K/DL; RBC 4.72 M/DL; HCT 29.0 %; BUN 31 mg/dL; CREA 0.4 mg/dL; ALT 165 U/L; AST 210 U/L; TP 1.3 g/dL; ALB 0.7 g/dL

표 33. 경기도 야생동물구조센터 너구리 혈액검사(procyte, catalyst) 결과 - 27개체

너구리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7.0-2.7	0.5-1.8	5.2-8.2	2.3-4.0	10-12.5	0-50
1	GG19	11.18	6.45	40.5	37	0.1	7.1	2.3	27	81
2	GG20	14.91	6.15	38.7	19	0.3	6.5	2.8	73	78
3	GG21	11.09	6.22	41.7	19	0.5	5.8	2.7	52	61
4	GG22	4.88	5.82	39.2	27	<0.1	6.8	2.2	46	52
5	GG23	15.3	6.3	40	16	0.4	6.3	2.8	51	76
6	GG24	13.99	5.28	37.1	51	0.2	6.8	2.2	22	53
7	GG25	6.83	3.14	20.6	32	0.2	7.8	2.5	21	67
8	GG26	8.09	4.15	26.1	39	<0.1	6.7	2.1	37	61
9	GG27	14.56	6.33	41.6	10	0.6	7	3.1	41	94
10	GG28	7.6	6.92	43.8	16	.	6.8	2.9	101	.
11	GG29	17.33	5.22	31.8	38	0.2	7.2	2.3	30	97
12	GG30	23.51	4.52	27.6	37	0.2	7.4	2.3	35	67
13	GG31	17.5	4.99	27.7	34	<0.1	8.9	2.6	107	188

14	GG32	21.8	3.78	22	44	0.2	7.2	2.3	47	53
15	GG33	23.76	5.21	31	26	<0.1	7.5	2.3	55	57
16	GG34	14.54	4.46	26.1	44	0.2	7.2	2.1	72	97
17	GG35	18.28	4.66	27.2	51	0.2	7.1	2.3	32	73
18	GG36	30.32	5.32	29	31	0.2	7.8	2.5	28	72
19	GG37	23.15	3.28	20.9	39	<0.1	6.8	2	48	79
20	GG38	12.15	2.37	13.5	9	0.7	7.6	3	41	.
21	GG39	23.34	7.51	44.2	15	0.5	7.3	2.9	107	87
22	GG40	15.61	7.39	43.9	30	0.5	7.9	2.9	84	72
23	GG41	17.28	6.49	39.5	17	0.3	8.3	3	102	82
24	GG42	21.26	7.52	45.2	24	0.4	8.6	3.1	174	121
25	GG43	27.22	7.58	43.2	25	0.5	7.8	2.9	119	103
26	GG44	15.84	8.45	49.5	28	0.8	6.7	2.7	183	94
27	GG45	20.3	8.25	45.4	24	0.6	7	2.8	66	78
28	GG46	16.31	5.88	36.5	22	0.6	7.4	2.8	80	104
29	GG47	4.98	9.98	61.9	17	0.5	7.3	2.7	87	76
30	GG48	16.57	6.8	41.4	18	0.6	7.3	3.4	123	67
31	GG49	17	7.44	44	18	0.8	7.6	2.8	173	87
32	GG50	17.04	8.93	53.5	22	1	7.4	3.4	76	66
33	GG51	14.21	7.85	50.3	19	0.8	8.3	3.8	129	85
34	GG52	9.94	7.6	48.1	25	0.8	7.8	3.8	97	97

*WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin
 *경기도 야생동물구조센터 너구리의 혈액검사 결과 평균값(34개체). WBC 16.11 K/DL; RBC 6.12 M/DL; HCT 37.4 %; BUN 27 mg/dL; CREA 0.5 mg/dL; ALT 75 U/L; AST 82 U/L; TP 7.3 g/dL; ALB 2.7 g/dL

표 34. 충북 야생동물구조센터 너구리 혈액검사(procyste, catalyst) 결과 - 5개체

너구리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
	Reference range (dog)	5.05-16.76	5.65-8.87	37.5-61.7	7.0-2.7	0.5-1.8	5.2-8.2	2.3-4.0	10-12.5	0-50
1	CB1	21.15	5.42	33.8	18	0.6	6.9	2.5	90	95
2	CB2	13.93	8.34	47.4	19	0.6	7.2	3.1	77	67
3	CB3	14.44	8.82	50.8	16	0.5	7.5	3.3	83	50
4	CB4	21.37	5.53	32.6	10	0.5	7.9	2.9	61	163
5	CB5	13.18	8.55	50.7	17	0.5	7.3	3.5	84	60

*WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin
 *충북 야생동물구조센터 너구리의 혈액검사 결과 평균값(5개체). WBC 16.81 K/DL; RBC 7.33 M/DL; HCT 43.1 %; BUN 16 mg/dL; CREA 0.5 mg/dL; ALT 79 U/L; AST 87 U/L; TP 7.4 g/dL; ALB 3.1 g/dL

표35. 강원도 내 기타 동물 혈액검사(procye, catalyst) 결과 - 13개체
(삽 5개체, 오소리 3개체, 족제비 3개체, 고양이 2개체)

삽	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
No.	Reference range (cat)	2.87-1 7.02	6.54-1 2.20	30.3-5 2.3	16-36	0.8-2.4	5.7-8.9	2.2-4.0	12-130	0-48
1	7-1042	0.15	0.16	0.7	48	0.7	7.5	3	73	72
2	7-1067	8.03	9.27	48.8	44	0.5	7.5	2.8	119	80
3	7-1079	2.31	6.05	28.3	29	1.1	7.7	3.2	68	89
4	8--25	11.2	11.05	44	27	0.7	8	3	61	83
5	8-89	1.82	5.26	22.4	30	0.7	8.2	3.1	53	85
오소리	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
No.	Reference range (badger)	2.00-1 0.00	6.35-1 1.20	37.0-5 5.0	10-45	0.4-0.9	5.2-7.3	2.6-3.8	82-289	28-120
1	8-502	7.1	11.12	49.9
2	8-546	2.19	10.41	46.5	63	.	7.6	3.1	<10	.
3	8-547	0.52	7.61	34.8	59	.	7.8	2.9	<10	.
족제비	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
No.	Reference range (badger)	2.00-1 0.00	6.35-1 1.20	37.0-5 5.0	10-45	0.4-0.9	5.2-7.3	2.6-3.8	82-289	28-120
1	8-121	4.29	11.82	55.6	49	0.5	7.4	3.6	131	.
2	8-125	6.42	12.62	68	103	0.9	7.6	3.3	231	471
3	8-306	4.48	7.46	40.2
고양이	개체번호	CBC			Chemistry					
		WBC	RBC	PCV	BUN	CREA	TP	ALB	ALT	AST
No.	Reference range (cat)	2.87-1 7.02	6.54-1 2.20	30.3-5 2.3	16-36	0.8-2.4	5.7-8.9	2.2-4.0	12-130	0-48
1	C10	17.75	8.06	40.7	18	1.1	8	2.9	67	105
2	C11	26.28	9.55	40.3	18	0.9	9.5	2.8	56	238

*WBC=white blood cell; RBC=red blood cell; HCT=hematocrit; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; TP=total protein; ALB=albumin
 *강원도 내 기타 동물은 삽 5두, 오소리 3두, 족제비 3두, 야생 고양이는 2두에서 실시함
 *강원도 내 삽의 혈액검사 결과 평균값(4개체, 비정상적으로 심각하게 낮은 결과가 나온 1개체는 제외). WBC 5.84 K/μL; RBC 7.91 M/μL; HCT 35.9 %; BUN 33 mg/dL; CREA 0.8 mg/dL; ALT 75 U/L; AST 84 U/L; TP 7.9 g/dL; ALB 3.0 g/dL
 *강원도 내 오소리의 혈액검사 결과 평균값(3개체, Chemistry 결과는 2개체의 평균). WBC 3.27 K/μL; RBC 9.71 M/μL; HCT 43.7 %; BUN 61.0 mg/dL; TP 7.7 g/dL; ALB 3.0 g/dL
 *강원도 내 족제비의 혈액검사 결과 평균값(3개체, Chemistry 결과는 2개체의 평균). WBC 5.06 K/μL; RBC 10.63 M/μL; HCT 54.6 %; BUN 76 mg/dL; CREA 0.7 mg/dL; ALT 181 U/L; TP 7.5 g/dL; ALB 3.5 g/dL
 *강원도 내 야생 고양이의 혈액검사 결과 평균값(2개체). WBC 22.02 K/μL; RBC 8.81 M/μL; HCT 41.0 %; BUN 18 mg/dL; CREA 1.0 mg/dL; ALT 62 U/L; AST 172 U/L; TP 8.8 g/dL; ALB 2.9 g/dL

2-3. 제2협동연구기관: 농림축산검역본부

1차년도 연구성과

1) 1907년 이후 국내 광견병 발생분석

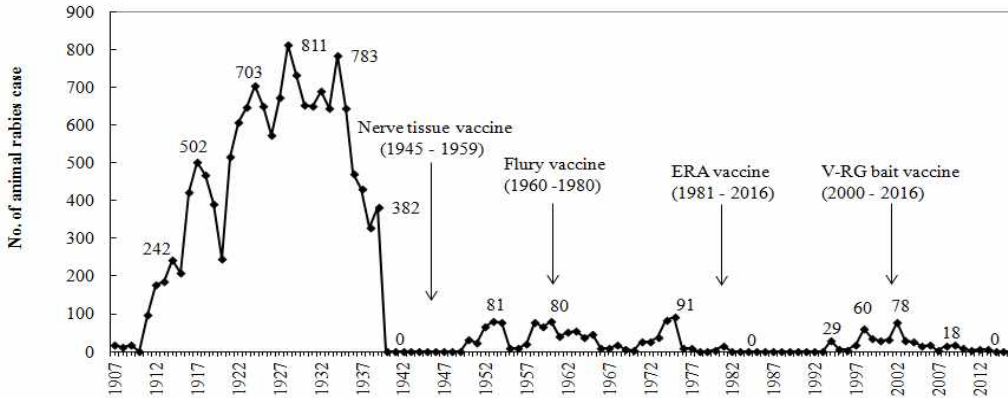


그림 54. 1907년 이후에 국내 광견병 발생 건수와 백신접종시기

광견병이 1907년 최초로 진단된 이후 2016년까지 16,134건의 발생보고됨. 광견병 백신을 접종하기전인 1907부터 1944년까지 년평균 383.6건이 발생함. 불활화조직을 이용한 광견병 백신을 사용한 시기인 1945-1959년까지 30.6건이 발생하였고, Fulry 백신을 적용한 1950-1980년까지 년 12.6건이 발생함. ERA strain을 접종한 1981-2016년까지 년평균 12.6건 그리고 VRG 백신을 적용한 2000-2016년까지 년 평균 16.7건의 광견병이 발생함.

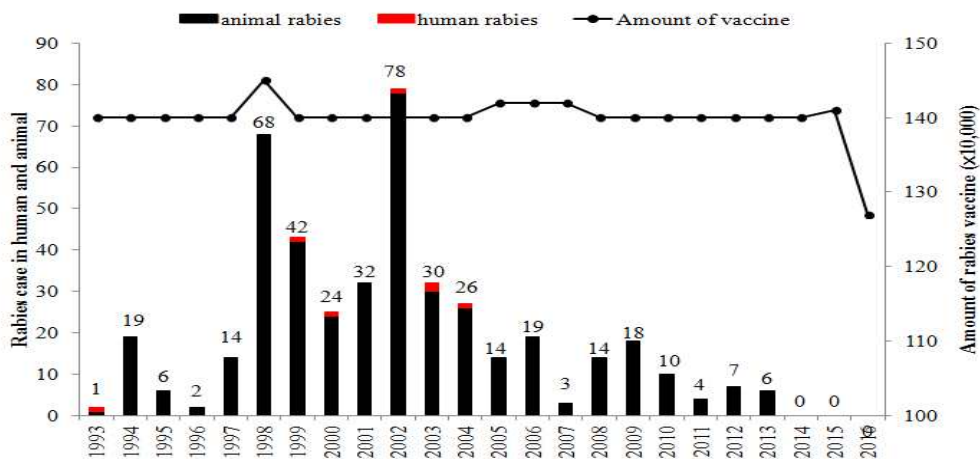


그림 55. 1993년 이후 사람과 동물에서 광견병 발생건수 및 동물용 광견병 주사백신 공급량

1993년부터 2016년까지 437건의 광견병발생이 보고되었고, 개체수로는 488두의 동물이 광견병에 감염되어 폐사함.⁴⁾

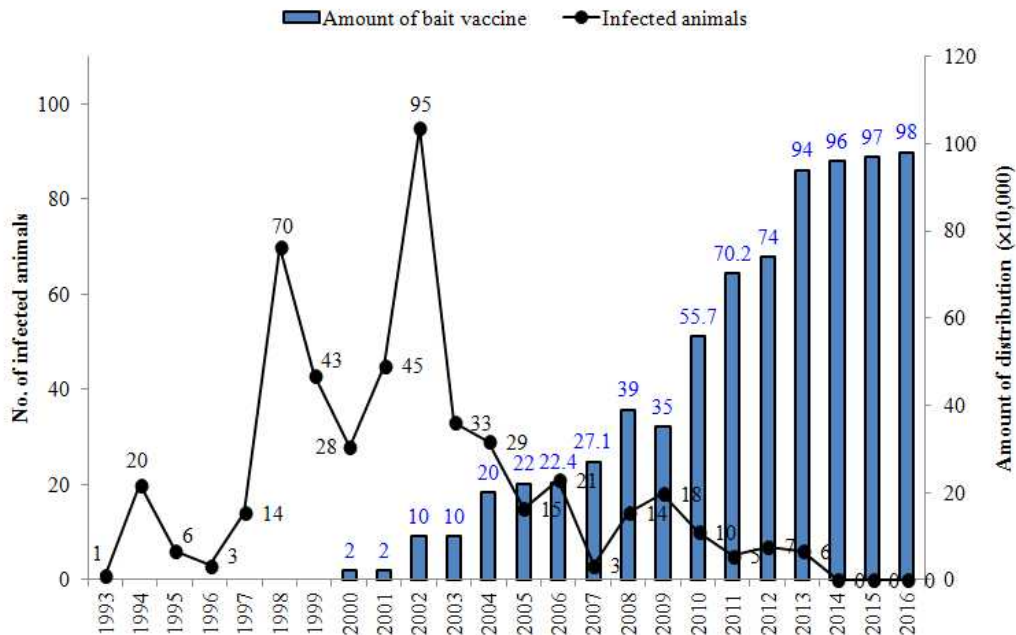


그림 56. 1993년 이후 광견병 년도 별 발생 두수 및 광견병 미끼백신 살포량과의 관계

광견병 미끼백신의 살포사업은 2000년도에 시범사업으로 시작하여 2016년까지 지속적으로 경기도와 강원도 그리고 서울에 살포함. 그림 56에서 보는 것과 같이 미끼백신을 살포하면서 광견병 발생두수는 점차 감소하게 되고 2014년 이후에는 광견병이 발생하고 있지 않음.⁴⁾

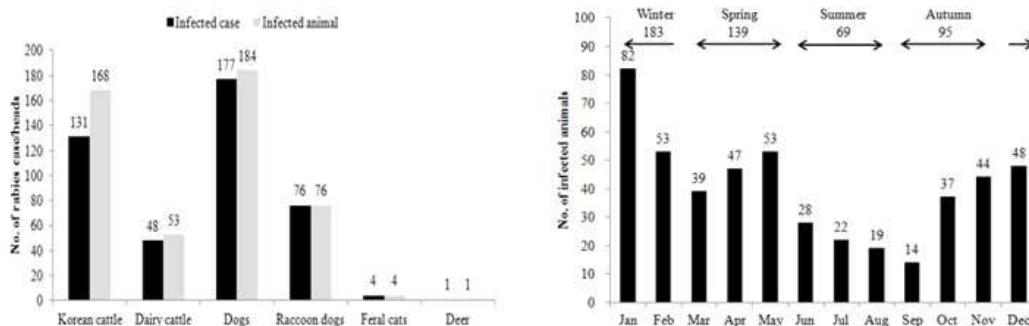


그림 57. 1993년 이후에 축종별 광견병 발생건수 및 두수와 월별 광견병 분포상황

1993년 이후에 발생한 광견병건수와 두수를 축종별로 분석한 결과 그림 57에서 보는 것과 같이 한우가 131건, 젓소가 48건, 개가 177건, 너구리가 76건, 고양이 1건, 사슴 1건으로 나타남. 소와 개에서 발생두수와 건수가 다른 것은 한 농장에 1두 이상 감염되어도 1건으로 취급하기 때문임. 또한 광견병의 발생을 계절별 및 월별로 분석한 결과 1월에 82건으로 가장 많이 발생하였으며, 겨울철(12,1,2월)에 183건으로 가장 많이 발생함. 이것은 너구리가 겨울철에 먹이를 찾아 농장으로 내려와 사료를 경쟁하면서 감염된 것으로 추정함.

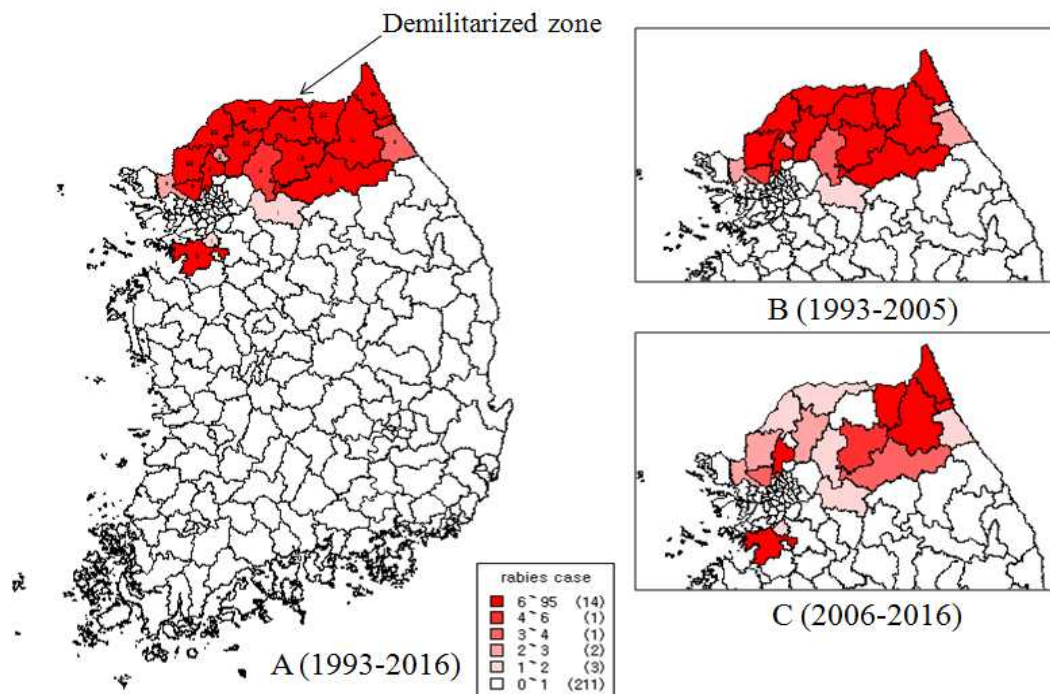


그림 58. 1993년 이후로 광견병 발생의 지역적 분포와 1993~2005년과 2006~2016년 사이에 발생한 광견병의 지리적 분포

광견병은 1985년부터 1992년까지 8년 동안 발생하지 않았음. 1985년 이전에는 주로 광견병은 개가 광견병을 전파하는 동물이었는데 1993년 이후는 주로 너구리에 의해 전파됨. 이러한 사실에 기초하여 1993년 이후에 발생한 광견병 발생을 지역적으로 분석한 결과 그림 58에서 보는 것과 같이 2005년까지는 DMZ와 가까운 지역에 광견병이 발생함. 미끼백신 살포정책이 시작되면서 2006년 이후에는 경기도 및 강원도 남쪽으로 발생이 이동하는 경향을 나타냄.⁴⁾ 2012-2013년도에 한강 이남인 수원과 화성에서 광견병이 발생하여 남쪽으로 이동함.

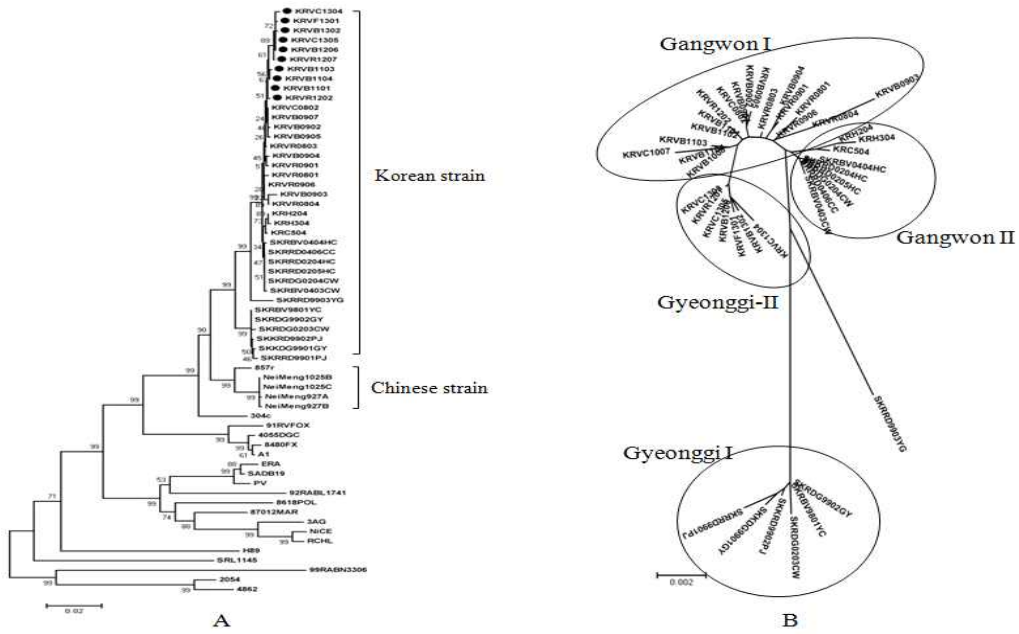


그림 59. 1998년 이후 발생한 광견병바이러스의 유전자 분석과 국내 분리주간 관련성

한국에서 발생한 광견병 바이러스와 가장 근연관계가 있는 광견병 바이러스는 중국의 동북부에서 보고한 NeiMeng1023B strain으로 나타남. 국내에서 발생하고 있는 광견병바이러스는 그림 59에서 보는 것과 같이 Artic-like virus로 분류됨. 국내 분리주 40개를 이용하여 분석한 결과 경기도와 강원도에서 분리된 바이러스간 근연관계가 차이가 있었으나 2012-2013년도 발생한 경기도 광견병 바이러스는 강원도에서 분리된 바이러스와 높은 상관관계를 나타내어 강원도에서 유입되었을 것으로 추정됨.

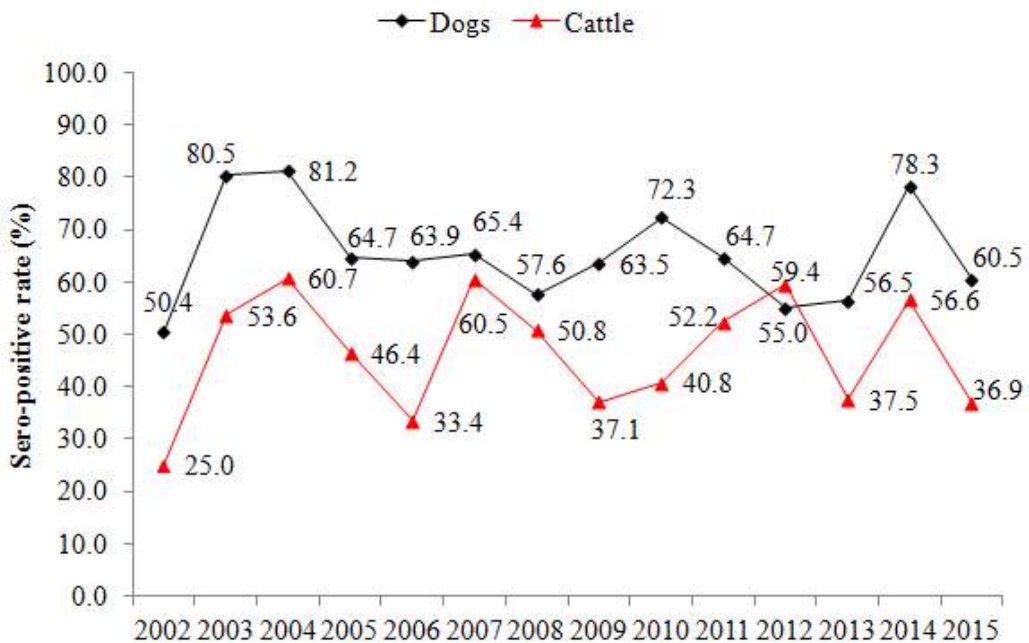


그림 60. 2002년 이후에 개와 소에서 광견병 항체 양성률

2002년 이후로 경기도 및 강원도 20개 시군에서 8,677두의 개와 5,677두의 소로부터 혈액을 수집함. 2002년 이후 평균 광견병 양성률은 개와 소에서 각각 65.3 및 46.5%를 나타냄. 연도별 광견병 항체 양성률은 그림 60에서 보는 것과 같이 개가 소보다 광견병 항체 양성률이 높게 나타나고 있으며, 항체률의 변동이 연도별로 차이가 있음을 알 수 있음. 이것은 항체양성률이 낮은 시군에 대하여 지속적인 홍보 때문인 것으로 추정됨.

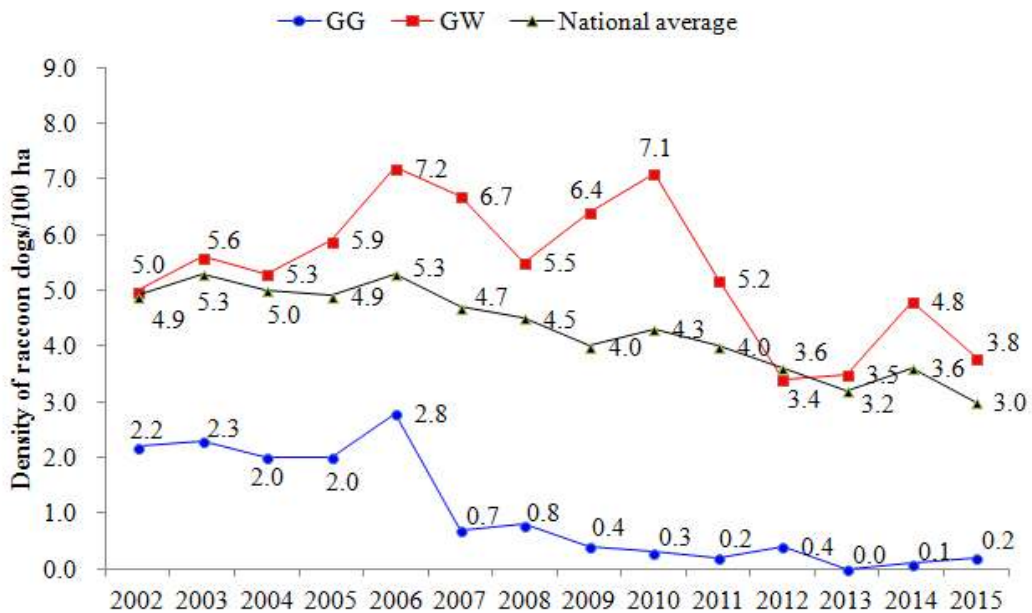


그림 61. 2002년 이후 확인된 국내 너구리의 서식밀도

국내 광견병을 전파하는 동물이 너구리로 확인되었기 때문에 국내의 너구리 서식밀도를 확인하는 것은 광견병의 발생을 예측하는데 도움이 됨. 그림 61에서 보는 것과 같이 국내 전체적인 너구리의 서식밀도는 2015년 3.0마리/100ha로 2002년 4.9두에 비하여 지속적으로 감소하고 있음. 또한 강원도의 경우 2010년 7.1로 높았으나 2015년 3.8두로 낮아졌으며, 경기도는 더욱 낮아 2015년도에 0.2두로 나타남. 그러나 경기도 안산의 시화호주변과 화성시에는 다른 시군보다 너구리의 밀도가 높음.

2) 너구리 광견병 혈청검사 및 의심축에 대한 광견병 정밀검사

가) 경기도 및 강원도에서 수집한 너구리혈청에 대한 광견병 항체검사

- 지역별 시료수: 경기도 18, 강원도 88
- 2016-2017년도에 경기도에서 너구리 18두, 강원도 88두 (너구리 41, 야생 고양이 7, 야생 개 40) 총 106두의 시료에 대한 광견병 항체검사를 FAVN test로 실시함.

표 36. 경기도 및 강원도의 야생 동물에서 광견병 항체검사 결과

축종	시료	양성개체	양성률
너구리	59	6	10.17
개	40	23	57.50
고양이	7	0	0.00
계	106	29	27.4

지역	시료	양성개체	양성률
경기	18	2	11.1
강원	88	27	30.7
계	106	17	16.0

표 36에서 보는 것과 같이 경기도 및 강원도에서 106두의 시료를 채취함. 106두에 대한 광견병 항체 양성률은 경기도 너구리는 11.1%, 강원도 너구리는 9.7%로 나타났으며, 전체 너구리 59두에 대한 양성률은 10.1%로 나타남. 그리고 강원도의 유기견과 유기고양이에 대한 광견병 항체양성률은 57.5% 및 0%로 나타남.

나) 너구리 뇌조직에서 광견병에 대한 항원검사

광견병의 항원검사의 표준검사법은 형광항체법 (FAT)이며, 보조적 진단법으로 유전자진단법이 사용되고 있음. 따라서 강원도에서 채취한 너구리 62개의 뇌조직에서 광견병 항원을 검사하기 위하여 뇌조직에서 FAT시험한 결과 모두 음성인 것을 확인함.

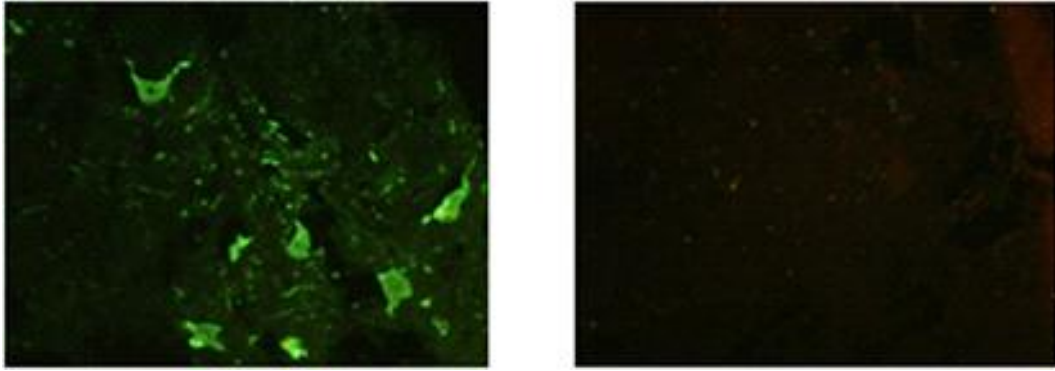


그림 62. 광견병 검사를 위한 FAT 양성 및 음성

광견병 진단의 보조적 시험법인 RT-PCR을 이용하여 광견병바이러스의 유전자를 확인한 결과 그림 62에서 보는 것과 같이 62개의 너구리 뇌조직에서 음성인 것을 확인함.

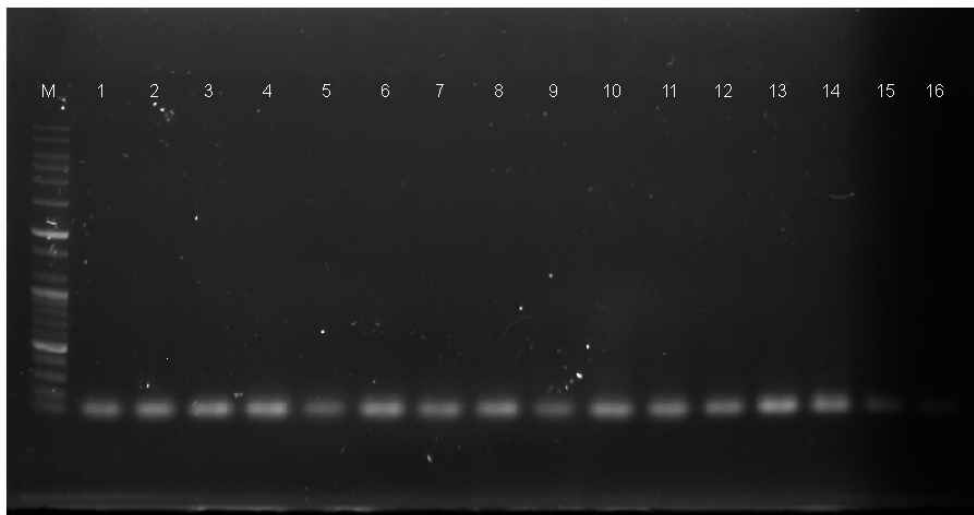


그림 63. 국내 야생 너구리의 뇌조직을 이용한 광견병 유전자 검사결과

3) 광견병 감별진단 키트 개발을 위한 유전자 클론 확보 및 작성
 가) ERAGS strain의 확인 및 RNA 추출

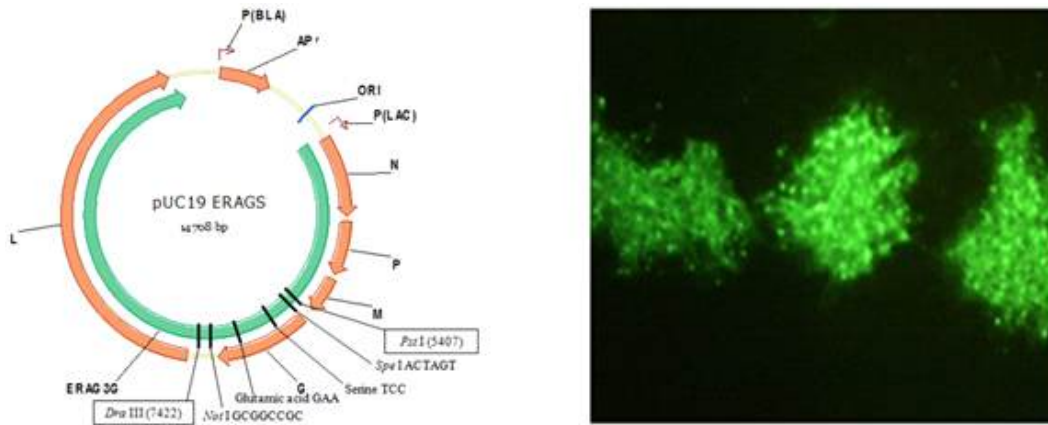


그림 64. ERAGS strain 작성 map과 ERAGS strain의 FA test

그림 64에서 보는 것과 같이 ERAGS를 기존의 광견병 생백신주인 ERA와 감별되도록 G gene의 194 및 333번째 아미노산을 아르기닌과 아스파라긴을 세린과 글로탐산으로 치환하여 재조합바이러스를 제작하였고, 이 바이러스에 대한 특이적인 항체를 이용하여 형광항체법으로 바이러스를 확인한 결과 광견병바이러스로 확인됨. 따라서 이 바이러스의 RNA를 추출하여 광견병 감별진단키트 개발을 위해 코젠바이오텍에 제공함.

나) VRG 미끼백신주의 확인 및 RNA 추출

2000년 이후에 국내에서 광견병 미끼백신으로 살포하고 있는 VRG strain을 Vero cell에 접종하여 확인한 결과 그림 65에서 보는 것과 같이 특이적인 CPE를 나타내었고, 광견병 G 단백질에 특이적인 항체를 적용한 결과 세포내에서 특이적인 형광을 나타냄. 바이러스의 함량은 $10^{8.0}$ TDID₅₀/ml 이상을 확인하였고 광견병 감별진단키트 개발을 위해 DNA를 추출하여 코젠바이오텍에 제공함.

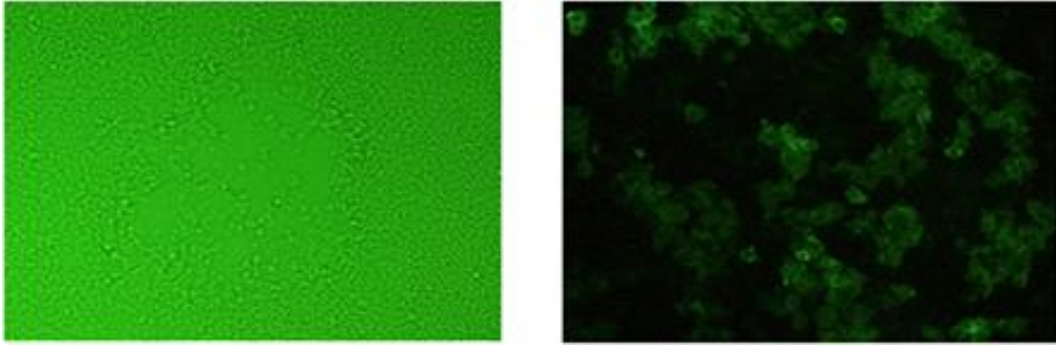


그림 65. Vero cell에 접종한 VRG strain의 CPE 및 광견병항체로 염색한 FA test

다) 광견병 G 단백질을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 확인과 DNA 추출

광견병 G 단백질을 발현하는 재조합아데노바이러스를 확인하기 위하여 293A cell에 바이러스를 접종하고 현미경을 관찰한 결과 그림 66 에서 보는 것과 같이 특이적인 CPE를 나타내었고, 바이러스 함량도 $10^{7.0}$ TDID₅₀/ml이상을 나타내었음. 그리고 이 바이러스의 형태를 전자현미경으로 확인한 결과 그림 66에서 보는 것과 같이 전형적인 아데노바이러스를 나타냄. 따라서 재조합 아데노바이러스의 DNA를 추출하여 코젠 바이오텍에 제공함.

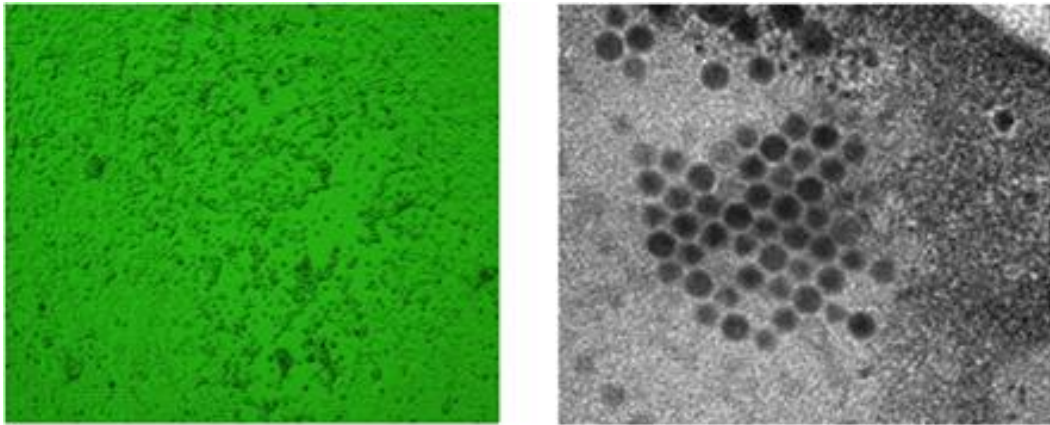


그림 66. 광견병 G gene을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 CPE 및 전자현미경사진

4) 광견병 감별진단 키트의 적용시험

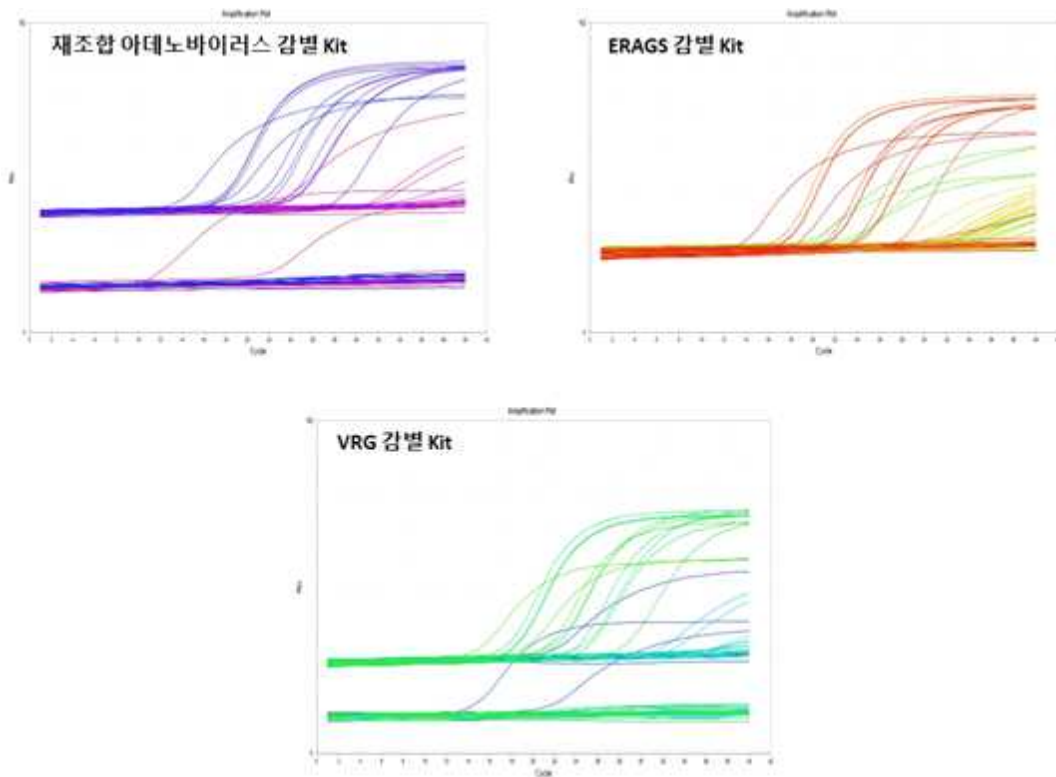


그림 67. 재조합아데노바이러스, ERAGS 및 VRG 미끼백신주의 감별을 위한 real-time PCR kit의 적용시험 결과

표 37. 3 종의 광견병 바이러스 감별 kit의 검출능 비교

Sample name	No. of sample	Detection of ERAGS kit		Detection of VRG kit		Detection of Adeno kit	
		RAV	ERAGS	RAV	VRG	RAV	Adeno
Wild isolates	10	10/10	1/10	10/10	0/10	10/10	0/10
Negative brain tissue	17	3/17	16/17	3/10	0/17	3/10	0/17
ERA strain	1	+	-	+	-	+	-
CVS11 strain	1	+	-	+	-	+	-
ERAGS strain	1	+	+	NT	NT	NT	NT
VRG strain	1	NT ^a	NT	-	+	NT	NT
Ad-0910G strain	1	NT	NT	NT	NT	-	+
Positive control (kit)	1	+	+	+	+	+	+
Negative control (DDW)	1	-	-	-	-	-	-

야외 광견병바이러스와 ERAGS, VRG, 광견병 재조합 아데노바이러스를 감별하는 real-time PCR kit를 야외 광견병 바이러스 시료 10개와 너구리 뇌조직 17개를 적용한 결과 표 37에 보는 것과 같이 3종 kit 모두 야외바이러스에 대하여 100% 검출할 수 있었음. 그러나 음성 뇌조직에 대하여 ERAGS kit는 17개중 16개의 비특이성을 나타내었고, VRG와 재조합아데노바이러스 kit도 3개의 비특이성을 확인할 수 있었음. 따라서 비특이적으로 보이는 시료에 대하여 바이러스 분리와 심층 분석이 필요하며, ERAGS와 감별하는 kit는 개선이 필요한 것으로 판단됨.

2차년도 연구성과

1) 국내 광견병 발생 분석

가) 광견병 국내 비발생 유지를 위한 전략

세계보건기구 (WHO), 세계동물보건기구 (OIE) 및 유엔 식량농업기구 (FAO)는 2030년까지 사람에서 광견병의 발생을 “0”으로 목표를 정하고 있다.⁵⁾ 이러한 목표를 현실화하기 위하여 OIE와 지역대표에서는 광견병 근절을 위한 국제적 표준화에 대한 워크숍을 수행하였다. 대한민국을 포함한 많은 아시아 국가들은 이러한 목표를 성취하기 위하여 노력하고 있다. OIE 육상동물건강코드에 따르면 광견병 청정국의 정의는 다음과 같은 요건을 갖추어야 한다. 1) 광견병은 의무적으로 보고하는 질병으로 분류하고 질병발생시 OIE에 보고하여야 한다. 2) 지속적인 광견병 조사가 이루어져야 하며, 3) 광견병의 예방을 위한 규칙적인 방역조치를 취하여야 하며, 4) 과거 2년 동안 광견병 발생이 없어야 하며, 5) 과거 6개월 동안 검역과정에서 광견병이 확인되지 않아야 한다.⁶⁾

대한민국은 1984년부터 1992년까지 8년 동안 광견병이 발생하지 않아 1993년에 광견병 비발생국으로 선언하였다. 불행하게도 비발생 선언 후 1년이 되지 않아 야생 너구리에 의해 전파된 개에서 광견병이 발생하여 광견병 청정국 지위를 상실하였다. 1993년 이후에 발생한 모든 광견병은 너구리에 전파된 것으로 소, 개 고양이, 사슴에서 발생하다가 2013년 2월 이후에 발생하고 있지 않다. 동물에서 광견병 비발생을 유지는 정부가 광견병 청정국 선언을 위한 필수조건이면서 많은 도전이 존재하는 것이 현실이다. 미끼백신을 살포하는 상세한 가이드라인, 비무장지대 근처에 완충지역의 설정, 동물이동에 대한 통제와 강화된 광견병근절 프로그램이 수행되어야 할 것이다.

나) 대한민국 광견병 근절프로그램의 운영

국가적인 광견병 근절프로그램은 1993년 이후 너구리가 광견병을 다른 동물에 전파한다는 사실에 기초하여 수행하여야 한다. 표 35에서 보는 것과 같이 총 437건의 광견병이 발생하였으며, 강원도는 동두천, 가평, 김포, 고양, 화성, 파주, 포천, 수원, 양주, 양평, 연천이며, 강원도는 철원, 춘천, 고성, 홍천, 화천, 인제, 양구, 양양이며, 서울은 은평구에서 발생하였다. 역학조사에 따르면 광견병의 발생은 야생 너구리에 기인한 것으로 확인되었다.

표 38. 1993년 이후 경기도, 강원도, 서울에서 발생한 광견병 건수

Year	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Gyeonggi (case)	0	8	3	2	4	50	29	21	17	57	19	7	6
Gyeonggi (head)	0	8	3	3	4	50	30	25	30	69	20	7	6
Gangwon (case)	1	11	3	0	10	18	13	3	15	21	11	19	8
Gangwon (head)	1	12	3	0	10	20	13	3	15	26	13	22	9
Seoul-si (case)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	1	19	6	2	14	68	42	24	32	78	30	26	14

Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Gyeonggi (case)	11	0	1	0	0	0	4	6	0	0	0	0	245
Gyeonggi (head)	11	0	1	0	0	0	4	6	0	0	0	0	277
Gangwon (case)	7	3	13	18	10	4	3	0	0	0	0	0	191
Gangwon (head)	9	3	13	18	10	5	3	0	0	0	0	0	208
Seoul-si (case)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	19	3	14	18	10	4	7	6	0	0	0	0	437

표 38에서 보는 것과 같이 광견병에 감염된 너구리에 의해 5종의 동물종이 감염되었고 너구리도 76두가 확인되었다.

표 39. 1993년 이에 광견병이 확인된 동물종과 건수

Species	Cattle	Dogs	Raccoon dogs	Feral cats	Deer	Total
No. of rabid case	179(41.0)	177(40.5)	76(17.4)	4(0.9)	1(0.2)	437
No. of rabid animal	221(45.5)	184(37.9)	76(15.6)	4(0.8)	1(0.2)	486

하지만 2013년 2월 이후로는 광견병의 발생은 보고되고 있지 않다. 발생보고가 없는 이유는 너구리에 대한 광견병 미끼백신의 살포량의 증가와 개에 광견병 백신의 접종으로 인한 것으로 추정된다. 그러므로 한국에서 동물에서의 광견병 비발생 유지를 위한 전략은 의무적인 백신접종, 반려동물의 등록의무화, 유기고양이의 중성화, 광견병 미끼백신의 지속 살포, 강화된 광견병 조사, 백신후 항체형성률 조사, 유기견의 관리, 위험도 평가를 통한 취약지역의 분석, 외국으로부터 광견병에 감염된 동물의 수입차단 등을 포함하여야 한다.

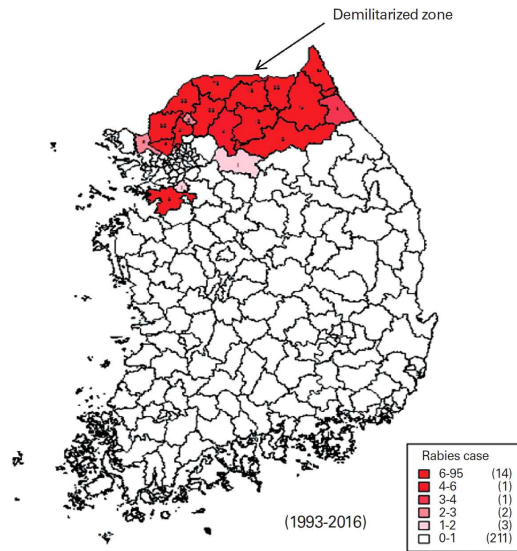
2) 광견병 비발생 유지를 위한 정책건의

양식 3-1		연구결과활용계획서				QIA-NRP
농림축산검역검사기술개발 정책건의 Policy Application (PA)		과제분류	외부재원(농기평)	연도	2018	
		과제번호	2016-269			
		기술코드				
		제안부서	바이러스질병과			
1. 과 제 명	광견병 미끼백신 살포지역의 항체모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발					
2. 제 목	광견병 위험지역, 완충지역의 지정 및 미끼백신 살포방법 개선					
3. 연구원	성 명	직 급	과 (부서)	연 구 실 (팀)	참여율(%)	
a. 주담당자	양동균	수의연구관	바이러스질병과	OIE광견병 표준실험실		
b. 담 당 자	김하현	수의연구사	바이러스질병과	OIE광견병 표준실험실		
4. 정책건의사항						
<ul style="list-style-type: none"> ○ 광견병 위험지역 및 완충지역(buffer zone)의 지정과 해제를 건의함 <ul style="list-style-type: none"> - 광견병 위험지역의 설정과 해제에 대한 규정이 없어 광견병 살포지역의 범위를 설정하기 곤란함 - 1993년 이후 광견병은 DMZ 인근 시군에서 발생하였으며, DMZ 남쪽방향으로 광견병에 감염된 너구리가 확산될 수 있음 - 광견병 위험지역은 최초 광견병이 발생한 지역으로 10년 동안을 기간으로 지정함 - 광견병 완충지역은 DMZ 인근 지역의 시군으로 지정함 ○ 광견병 미끼백신은 광견병 위험지역과 완충지역에 살포할 것을 건의함 <ul style="list-style-type: none"> - 광견병 미끼백신의 살포 범위가 유연성이 있으며, 예산절감 효과가 있음 ○ 광견병 미끼백신의 살포방법의 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 현재 광견병 미끼백신의 살포방법은 인력을 동원하여 직접 살포하는 방법을 채택함 - 봄 및 가을에 산불방지용으로 준비되어 있는 헬리콥터나 드론과 같은 기타 비행체를 이용하는 방법을 추가적으로 기술하여 직접 및 비행기를 이용한 살포방법을 다변화 						
5. 정책건의 내용요약						
<ul style="list-style-type: none"> ○ 가축방역 및 축산물안전 사업 실시요령의 야생동물 광견병 (미끼예방약)부분에 광견병 위험지역과 완충지역을 정의하고 광견병 위험지역과 완충지역에 광견병 미끼백신을 살포토록 건의함. <ul style="list-style-type: none"> - 광견병 위험지역은 신규로 광견병이 발생한 지역을 포함하여 광견병이 발생한지 10년 동안을 광견병 위험지역으로 설정하고 11년째에는 해제 - 광견병 완충지역은 DMZ 인근 시군으로 설정 ○ 광견병 미끼백신의 살포방법의 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 봄 및 가을에 산불방지용으로 준비되어 있는 헬리콥터나 드론 등 비행체를 이용하는 광견병 미끼백신을 살포 방법을 추가 기술하여 살포방법의 다변화 						
6. 색인용어	광견병, 미끼백신살포, 광견병 위험지역, 완충지역					
과제책임자	양 동 균	(서명)	과 장	조 인 수	(서명)	
2018 년 월 일						
본 연구과제 성과를 국가 정책반영 사항으로 건의합니다.						
농림축산검역본부장 귀하						

과 제 명 (영 문)	광견병 미끼백신 살포지역의 항체모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발				과 제 번호
					2016-269
제 목	광견병 위험지역, 완충지역의 지정 및 미끼백신 살포방법 개선				
주담당자	양동군	직급	수의연구관	소속	바이러스질병과
담 당 자					

1. 현황 및 문제점

- 가축전염병예방법(이하 가전법) 제2조 제2항에 따르면, 광견병은 제2종 가축전염병에 속하여 있음.



<그림> 한국 내 광견병 발생 분포(Yang et al., 2017)

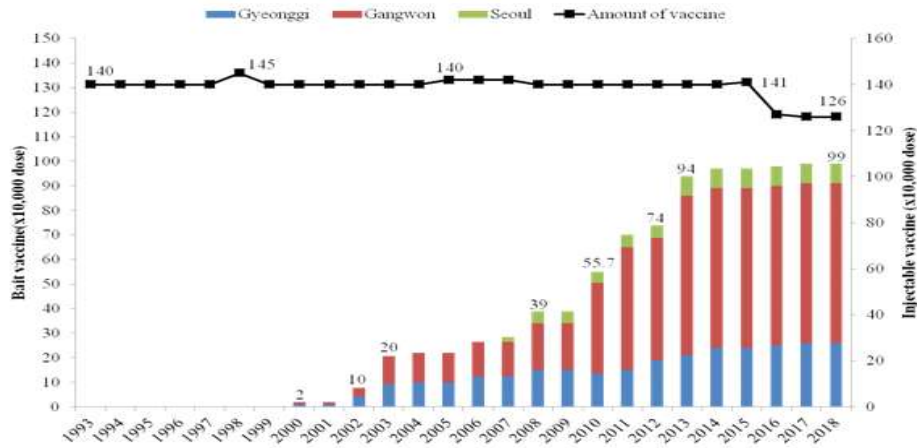
- 광견병 미끼백신의 살포지역은 1993년 이후 광견병이 발생하고 있는 강원도, 경기도 및 서울 은평구를 대상으로 살포 중임.
 - 광견병 미끼백신의 살포수량은 2000년 최초 2만 두 분을 시작으로 점차 증가하여 2018년 99만 두 분을 살포하고 있음.
- 가전법 3조의4에 의하면, 제1종 가축전염병이 자주 발생하였거나 발생할 우려가 높은 지역을 중점방역관리지구로 지정하거나 해제할 수 있으나, 제2종 가축전염병인 광견병 위험지역에 대한 지정과 해제의 규정은 없음.
 - 광견병 미끼백신의 살포지역은 국립환경연구원 등 야생동물 전문기관의 자문을 받아 결정한다고 되어있을 뿐 세부 규정은 없음(2018년 가축방역 및 축산물안전 사업 실시요

령).

- 미끼백신의 살포 방법은 인력을 동원하여 직접 살포방법을 실시하고 있으나, 산악 지역 등 접근이 불가능한 지역과 너구리 밀집지역 등에 살포하는 것은 인력으로의 한계가 있어 효율적인 방법을 모색할 필요가 있음.

2. 주요 조사내용

- 1993년 이후 광견병 백신과 발생 동향



<그림> 1993년 이후 광견병 백신과 미끼백신살포수량 변화

<표 1> 1993년 이후 지역별, 연도별 광견병발생 건수

Year	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Gyeonggi(case)	0	8	3	2	4	50	29	21	17	57	19	7	6
Gyeonggi(head)	0	8	3	3	4	50	30	25	30	69	20	7	6
Gangwon(case)	1	11	3	0	10	18	13	3	15	21	11	19	8
Gangwon(head)	1	12	3	0	10	20	13	3	15	26	13	22	9
Total(case)	1	19	6	2	14	68	42	24	32	78	30	26	14
Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Gyeonggi(case)	12	0	1	0	0	0	4	6	0	0	0	0	246
Gyeonggi(head)	12	0	1	0	0	0	4	6	0	0	0	0	278
Gangwon(case)	7	3	13	18	10	4	3	0	0	0	0	0	191
Gangwon(head)	9	3	13	18	10	5	3	0	0	0	0	0	208
Total(case)	19	3	14	18	10	4	7	6	0	0	0	0	437

- 국내 공공기관 소유 헬리콥터(회전익 항공기) 소유 현황

- 국내 항공기는 총 787대(경량 항공기 제외)로 그중 회전익 항공기(헬리콥터)는 193대로 조사됨. 공공기관 항공기는 총 74대로 37.8%로 비중이 적은 편임.
- 경기도 및 강원도 지자체 소유 항공기는 대부분 119 구급용임. 산림청 소속 헬리콥터는 대부분 산불방제용(KA-32T)으로 파악됨.

<표 2> 공공기관 항공기 소유 현황(ATIS 항공안전관리시스템, atis.koca.go.kr)

소유자(사용자)	비행기	회전익 항공기	계	소유자(사용자)	비행기	회전익 항공기	계
(주)스펙코어	1	0	1	산림청	0	45	45
강원도	0	2	2	서울시	0	3	3
경기도	0	3	3	울산광역시	0	1	1
경상남도	0	1	1	인천광역시	0	2	2
경상북도	0	2	2	전라남도	0	2	2
광주광역시	0	1	1	전라북도	0	1	1
국립공원관리공단	0	1	1	중앙119구조본부	0	4	4
대구광역시	0	2	2	충청남도	0	1	1
부산광역시	0	2	2	충청북도	0	1	1
비행점검센터	2	0	2	총계	3	74	77

- 비행금지구역으로 설정되지 않은 지역에서 헬리콥터를 포함한 비행체의 운용은 각 기관에 허가를 받아 운용될 수 있으므로 이에 따른 내용도 같이 검토 되어야 함.



※ P518 지역은 휴전선 인근 지역으로 합동참모본부(항공작전과)의 허가를 득하여 운용 되어야 함(전화 : 02-748-3294, 팩스 : 02-796-7985)

3. 정책건의 사항

- 가축방역 및 축산물안전 사업 실시요령
- 야생동물 광견병(미끼예방약) 항목에 광견병 위험지역의 설정·해제 및 완충지역(buffer zone)의 내용을 추가 기술할 것을 건의함.
 - 광견병 위험지역은 광견병이 발생한 10년 동안의 시군
 - 광견병 buffer zone은 DMZ 인근 시군
- 야생동물 광견병(미끼예방약)에 광견병 미끼백신 살포방법을 헬리콥터, 드론 등 항공기를 이용한 방법을 추가 기술할 것을 건의함
 - 광견병의 미끼백신은 10-18개/km²가 살포되어야 하나 인력에 의한 살포는 제한된 지역에 살포할 가능성이 높고, 산악 지역 등 접근이 불가능한 지역과 너구리 밀집지역 등에 살포하는 것은 한계가 있음.

- 미끼백신의 살포방법은 헬리콥터 및 드론을 이용한 항공방제 방법을 추가 기술 필요

현행		개정할 사항	
가축방역 및 축산물안전 사업 실시요령(야생동물 광견병(미끼예방약))			
지원대상	서울·경기·강원 지역 광견병 발생 시·군 및 인접 시·군	지원대상	서울·경기·강원 지역 광견병 발생 시·군 및 인접 시·군 등 위험지역 및 완충지역(buffer zone)
살포방법	인력을 동원, 살포지점에 직접 살포	살포방법	인력, 헬리콥터, 드론 등을 동원, 살포지점에 직접 살포

4. 기대효과

- 광견병 미끼백신의 수급조절은 광견병 위험지역의 지정과 해제 및 buffer zone에 따라서 유연하게 되어 제한된 예산을 절감할 수 있음
 - 미끼백신의 살포지역이 명확하게 됨
 - 경기도와 강원도의 개와 소에 광견병 혈청검사사업도 광견병 위험지역의 지정과 해제에 연계되어 실시
- 미끼백신의 살포방법을 다변화함으로써 지정된 지역을 지정된 수량만큼 신속하게 살포될 것으로 기대됨

국민의 나라 청치로운 대한민국



농림축산검역본부



수신 농림축산식품부장관(조류인플루엔자방역과장)
(경유)

제목 농림축산식품 연구개발사업 추진관련 정책건의

1. 농림수산식품기술기획평가원의 농림축산식품 연구개발사업 「광견병 미끼백신 살포 지역의 황체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발, 주관기관 (주)코젠바이오텍」 제2협동연구(광견병 미끼백신 살포지역의 황체 모니터링을 위한 포획너구리에서의 광견병 황체가 검사 및 광견병 발생정보 분석, 과제책임자 양동균 수의연구관)와 관련됩니다.
2. 우리 과에서 수행 중인 농림수산식품연구개발사업 연구과제의 추진으로 도출된 정책건의를 아태와 같이 제안하오니 검토해 주시기 바랍니다.

과제명(주관기관)	제2협동연구 과제명 (과제책임자)	연구기간	정책건의명
광견병 미끼백신 살포 지역의 황체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 [주)코젠바이오텍]	제2협동연구: 광견병 미끼백신 살포지역의 황체 모니터링을 위한 포획너구리에서의 광견병 황체가 검사 및 광견병 발생정보 분석 (양동균 수의연구관)	2016.9.5 - 2018.9.4 (2년)	광견병 위험지역, 완충지역의 지정 및 미끼백신 살포 방법 개선

붙임 1. 정책건의-광견병위험지역완충지역 설정 및 살포방법 개선. 끝.

양식 3-1 연구결과활용계획서

QIA-NRP

농림축산검역검사기술개발 정책건의 Policy Application (PA)	과제분류	외부재원(농기평)	연도	2018
	과제번호	2016-269		
	기술코드			
	제안부서	바이러스질병과		

1. 과 제 명	광견병 미끼백신 살포지역의 항체모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발				
2. 제 목	광견병 백신과 관련한 동물보호법 시행령 개정 건의				
3. 연구원	성명	직급	과(부서)	연구실(팀)	참여율(%)
a. 주담당자	양동균	수의연구관	바이러스질병과	병원체자원연구실	
b. 담당자	김하현	수의연구사	바이러스질병과	OIE광견병 표준실험실	

4. 정책건의사항

- 동물보호법 시행령
 - 3조의 내용 “법 제2조제2호에서 “대통령령으로 정하는 동물”이란 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개를 말한다.”를 “법 제2조제2호에서 “대통령령으로 정하는 동물”이란 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개 및 고양이를 말한다.”로 개정할 것을 건의함.
 - 3조 1항의 내용 “「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개”를 “「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개 또는 고양이”로 개정할 것을 건의함.
 - 3조 2항의 내용 “제1호에 따른 주택·준주택 외의 장소에서 반려(伴侶) 목적으로 기르는 개”를 “제1호에 따른 주택·준주택 외의 장소에서 반려(伴侶) 목적으로 기르는 개 또는 고양이”로 개정할 것을 건의함.
- 동물보호법 시행규칙
 - 동물보호법 시행규칙 [별지 제1호서식]의 내용 중 “광견병 백신 접종 여부”를 추가할 것을 건의함.

5. 정책건의 내용요약

- 광견병은 가축전염병예방법(이하 가전법)에 제2종 가축전염병으로 구분되어 있음. 동법 15조 1항에 의거 가축 소유자에게 면역요법을 명할 수 있고, 가전법 시행규칙 제17조에 따라 그 내용이 고시되어야 함. 또한, 동법 제20조 제3항에 의거 광견병 예방 접종을 받지 않는 개나 고양이에 대해서는 억류, 살처분 그리고 기타 필요사항을 명할 수 있고, 동법 60조 4항에 의거 과태료처분을 할 수 있으나, 동물 등록 시 광견병 예방 주사에 대한 확인 여부는 필수사항은 아님.
- 동물등록제가 정착됨에 따라 등록 대상 동물을 고양이까지 확대하고, 인수공통 전염병인 광견병 예방주사를 필수사항으로 정착시키기 위해 동물보호법 개정을 통해 사람 및 반려동물의 질병 발생을 막을 수 있는 법적 근거를 갖추고자 함.

6. 색인용어 광견병, 예방 백신, 인수공통 전염병,
 과제책임자 양 동 균 (서명) 과 장 조 인 수 (서명)

2018 년 월 일
 본 연구과제 성과를 국가 정책반영 사항으로 건의합니다.

농림축산검역본부장 귀하

정책건의 기술서

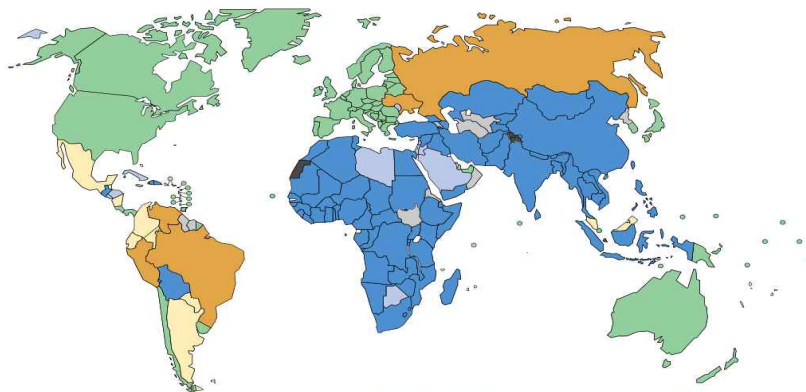
과 제 명 (영 문)	광견병 미끼백신 살포지역의 항체모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발				과 제 번호	
					2016-269	
제 목	광견병 백신과 관련한 동물보호법 시행령 개정 건의					
주담당자	양동군	직급	수의연구관	소속	바이러스질병과	
담 당 자						

1. 현황 및 문제점

- 가축전염병예방법(이하 가전법) 제2조 제1항에 따르면, 가축은 소, 말, 당나귀, 노새, 면양·염소, 사슴, 돼지, 닭, 오리, 칠면조, 거위, 개, 토끼, 꿀벌, 고양이, 타조, 메추리, 꿩 및 기러기 등이 속하고 있음. 동법 제2조 제2항에서 제2종 가축전염병은 탄저, 기종저 및 광견병 등이 속하여 있음.
- 광견병은 전 세계적으로 매년 약 5만 5천명의 사망자가 발생하는 것으로 추정되고, 95%가 아시아와 아프리카에서 농촌 지역을 중심으로 발생. 한국은 1920~ 30년대까지 지속적 발생 후 백신이 보급된 1950년대를 기점으로 발생이 감소. 2013년 이후 동물에서 광견병 발생이 없으며, 사람도 2004년 이후 발생이 없음.

연도	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
발생	43	28	45	95	33	29	15	21	3
연도	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
발생	14	18	10	5	7	6	0	0	0

(자료: 국가동물방역시스템(KAHIS))



(자료: WHO, 2017)

<그림 1> 국가별 광견병 발생 분포(■: 미 발생지역, ■: 지속 발생지역)

- 1999년 이후 통계에 의하면 발생 동물은 소(43%), 개(37%), 너구리(19%)가 대부분

(99%)을 차지하고 나머지는 고양이(4건)에서 발생. 지역별로 강원(56%), 경기(43%)가 대부분(99%)을 차지하고, 서울(은평구)에서 1건 발생함.

- 국내 반려동물은 대부분 개와 고양이로, 그 중 개에 대해서는 2014년도부터 동물등록을 의무화하였으며, 2016년도 말 현재 약 100만두가 등록됨. 2016년도 구조된 유실·유기 동물은 약 9만두로 지자체의 적극적 구조 등에 의해 작년대비 9.3% 증가되었으나, 동물등록제에 의해 소유주 인도가 점차 증가되고 있음(2016 동물보호와 복지관리 실태, 2017. 농림축산검역본부).
- 고양이는 생후 7~8주령부터 백신프로그램에 의해 종합예방주사(CVR-C)를 3차례에 걸쳐 2주 간격으로 접종하며, 전염성 복막염 예방 접종(1, 2차), 광견병 예방 접종(3차)을 동시에 진행하고, 주기적으로(1년) 추가 접종을 하도록 권고됨.
- 광견병 예방 접종과 관련하여 가전법 15조 1항에 의거 가축 소유자에게 면역요법을 명할 수 있고, 가전법 시행규칙 제17조에 따라 그 내용이 고시되어야 함. 동법 제20조 제3항에 의거 광견병 예방 접종을 받지 않는 가축에 대해서는 억류, 살처분 그리고 기타 필요사항을 명할 수 있고, 동법 60조 4항에 의거 과태료처분을 할 수 있으나, 동물 등록 시 광견병 예방 접종에 대한 확인 사항은 필수 항목은 아님.
- 유기동물의 적극적 구조 및 동물보호법의 시행에 따른 동물등록제가 정착됨에 따라 등록 대상 동물을 고양이까지 확대하고, 인수공통 전염병인 광견병 예방주사를 필수사항으로 정착시키기 위해 동물보호법 개정을 통해 인류 및 반려동물의 질병 발생을 막을 수 있는 법적 근거를 갖추하고자 함.

2. 주요 내용

- 광견병을 근절하는 여러 가지 방법 중 동물등록제에 개와 고양이를 포함하여 광견병백신을 접종토록하는 것이 중요한 것으로 파악됨

3. 정책건의 사항

- 동물보호법 시행령
 - 3조의 내용 “법 제2조제2호에서 "대통령령으로 정하는 동물"이란 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개를 말한다.” 를 “법 제2조제2호에서 "대통령령으로 정하는 동물"이란 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개 및 고양이를 말한다.” 로 개정할 것을 건의함.
 - 3조 1항의 내용 “「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개” 를 “「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개 또는 고양이” 로 개정할 것을 건의함.
 - 3조 2항의 내용 “제1호에 따른 주택·준주택 외의 장소에서 반려(伴侶) 목적으로 기르는 개” 를 “제1호에 따른 주택·준주택 외의 장소에서 반려(伴侶) 목적으로 기르는 개 또는 고양이” 로 개정할 것을 건의함.

○ 동물보호법 시행규칙

- 동물보호법 시행규칙 [별지 제1호 서식]의 내용 중 “광견병 백신 접종 여부” 를 추가할 것을 건의함.

현행		개정할 사항	
동물보호법 시행령			
....
3조 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개를 말한다.	3조 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 월령(月齡) 3개월 이상인 개 및 또는 고양이 를 말한다.”
3조 1항	「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개.....	3조 1항	「주택법」 제2조제1호 및 제4호에 따른 주택·준주택에서 기르는 개 또는 고양이
3조 2항반려(伴侶) 목적으로 기르는 개.....	3조 2항반려(伴侶) 목적으로 기르는 개 또는 고양이
동물보호법 시행규칙			
별지 제1호 서식		별지 제1호 서식	별도 첨부

4. 기대효과

- 광견병 백신의 접종은 국내 광견병 근절의 가장 중요한 요소이므로 지속적인 광견병 예방 효과를 높일 수 가장 좋은 방법으로 동물보호법 개정을 통해 동물등록시 예방접종 여부를 확인토록 하여 광견병백신 접종률 향상을 기대할 수 있음.
- 가장 대표적인 반려동물은 개와 고양이로 동물보호법 상의 등록 대상은 개로 한정되어 있어, 본 규정의 개정으로 인하여 고양이까지 확대됨에 따라 대표적인 반려동물의 등록을 통해 국내 개와 고양이의 정확한 개체수의 추정 및 관리를 지속적으로 개선할 수 있을 것으로 기대됨.



농림축산검역본부



수신 수신자 참조

(경유)

제목 농림축산식품 연구개발사업 추진관련 정책건의

1. 농림수산물기술기획평가원의 농림축산식품 연구개발사업 「광견병 미끼백신 살포 지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발, 주관기관 (주)코젠바이오텍」 제2협동연구(광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링을 위한 포획너구리에서의 광견병 항체가 검사 및 광견병 발생정보 분석, 과제책임자 양동군 수의연구원)와 관련됩니다.
2. 우리 과에서 수행 중인 농림수산물연구개발사업 연구과제의 추진으로 도출된 정책건의를 아래와 같이 제안하오니 검토해 주시기 바랍니다.

과제명(주관기관)	제2협동연구 과제명 (과제책임자)	연구기간	정책건의명
광견병 미끼백신 살포 지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 [주)코젠바이오텍]	제2협동연구: 광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링을 위한 포획너구리에서의 광견병 항체가 검사 및 광견병발생정보 분석 (양동군 수의연구원)	2016.9.5 - 2018.9.4 (2년)	광견병 백신과 관련한 동물보호법 시행령 개정 건의

붙임 1. 정책건의-동물보호법 개정. 끝.

3) 야생동물에서 광견병 혈청검사 및 의심축에 대한 광견병 정밀검사

가) 경기도 및 강원도에서 수집한 너구리혈청에 대한 광견병 항체검사

- 지역별 시료수는 울산 2, 충북 5, 경기도 34, 강원도 66개체였다.
- 2017. 10월 - 2018년 8월까지 수집된 혈청(삽 5, 오소리 3, 족제비 3, 너구리 94, 고양이 2두)에 대하여 총 107두의 시료에 대한 광견병 항체검사를 FAVN test로 실시하였다.

표 40. 지역별 광견병 혈청검사 결과

지역	시료	양성개체	양성률
울산	2	0	0
충북	5	1	20
경기	34	3	8.8
강원	66	13	19.7
계	107	17	15.9

표 41. 축종별 광견병 혈청검사 결과

축종	시료	양성개체	양성률
삽	5	0	0
오소리	3	1	33.3
족제비	3	1	33.3
너구리	94	15	16.0
고양이	2	0	0.0
계	107	17	15.9

표 40 및 41에서 보는 것과 같이 충북, 울산, 경기도 및 강원도에서 107두의 시료를 채취하였다. 107두에 대한 광견병 항체 양성률은 울산은 0%, 충북은 20%, 경기도는 8.8%, 강원도는 19.7%로 나타났으며, 전체 양성률은 15.97%로 나타났다. 축종별 광견병 항체가 삽 0%, 오소리 33.3%, 족제비 33.3%, 너구리 16.0%, 고양이 0%를 나타내었다.

표 42. 2년간 지역별 광견병 혈청검사 결과

지역	시료	양성개체	양성률
울산	2	0	0
충북	5	1	20
경기	52	5	9.6
강원	154	40	26.0
계	213	46	21.6

표 43. 2년간 축종별 광견병 혈청검사 결과

축종	시료	양성개체	양성률
삽	5	0	0
오소리	3	1	33.3
족제비	3	1	33.3
너구리	153	21	13.7
개	40	23	57.5
고양이	9	0	0.0
계	213	46	21.6

나) 너구리 뇌조직에서 광견병에 대한 항원검사

광견병의 항원검사의 표준검사법은 형광항체법 (FAT)이며, 보조적 진단법으로 유전자진단법이 사용되고 있다. 따라서 강원도에서 채취한 너구리 20개의 뇌조직에서 광견병 항원을 검사하기 위하여 뇌조직에서 FAT시험한 결과 모두 음성의결과를 나타내었다.

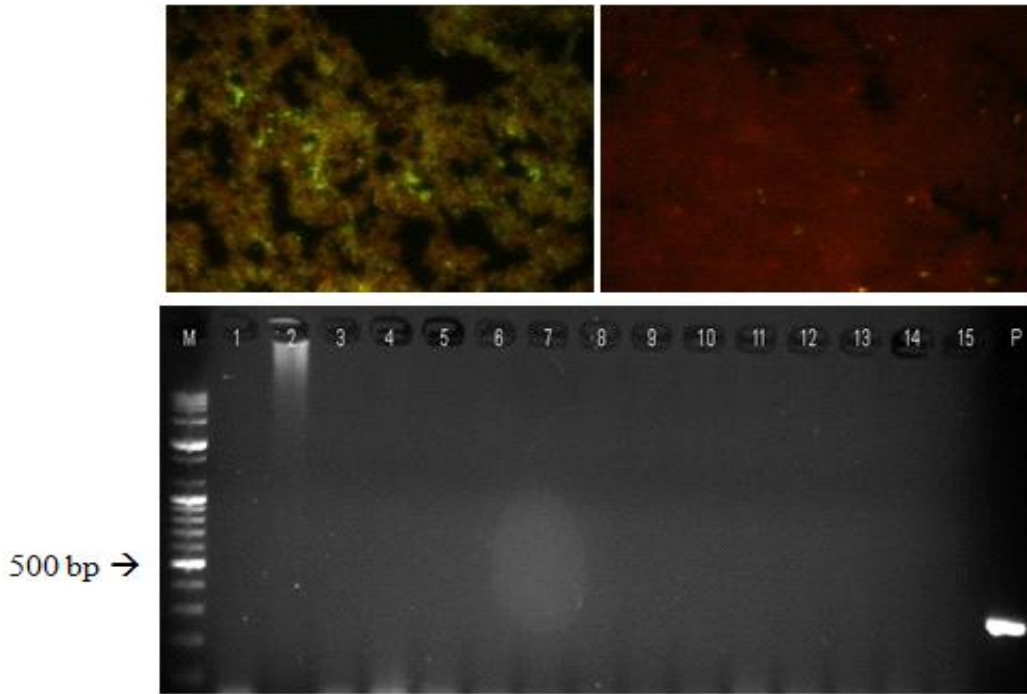


그림 68. 광견병 검사를 위한 FAT 양성, 음성 및 RT-PCR

광견병 진단의 표준시험법인 형광항체법과 보조적 시험법인 RT-PCR을 이용하여 너구리 뇌조직 20개를 시험한 결과 형광항체법과 RT-PCR법에서 모두 음성으로 확인되었다.

표 44. 2년간 광견병 항원 결과

구분	축종	시료	양성개체	양성률
1차년도	너구리	62	0	0
2차년도	너구리	20	0	0
	계	82	0	0

다) 미끼백신살포 지역에서 포획한 너구리의 광견병 항체가가 낮은 이유

너구리에서 다른 동물로 광견병의 전파를 차단할 목적으로 광견병을 전파하는 너구리를 면역하기 위하여 미끼백신을 2000년 이후부터 살포하고 있다. 미끼백신의 살포는 광견병 발생건수를 줄이는데 큰 공헌을 하였다. 하지만 본 연구과제에서 강원도 및 경기도에서 포획한 너구리의 광견병 항체가를 조사하였다. 그 결과 예상보다 낮은 17%의 너구리만 광견병 항체를 소유한 것으로 확인되었다. 첫 번째의 이유로는 광견병 미끼백신을 살포하는 지역과 너구리를 포획한 지역이 차이가 발생하여 낮은 것으로 추측해본다. 미끼백신의 살포는 동물 즉 소를 사육하는 농장주변과 너구리가 출몰하는 지역에 사람이 직접살포하고 있다. 따라서 아래의 정책을 건의한 광견병 미끼백신의

살포방법 개선을 통해 해결할 수 있으리라 여겨진다. 두 번째의 이유는 현재 미끼백신으로 살포하고 있는 VRG백신은 너구리의 기호성은 매우 좋은 것으로 여겨진다. 하지만, 그림 69에서 보는 것처럼 영리한 너구리가 미끼백신의 미끼만 섭취하고 백신이 들어있는 부위를 먹지 않기 때문에 너구리가 광견병에 대한 항체가를 갖지 못한 것으로 추정할 수 있다. 따라서 이러한 문제점은 국내에서 미끼백신을 생산하여 살포하는 것이 제일 좋은 방법이나, 현재 상용화되어 있는 제품이 없는 실정이다. 이러한 비슷한 경우가 캐나다에서도 확인 되었다. 캐나다에서 두 종류의 광견병 미끼백신(ONRAB, RABORA-VRG)을 살포하고 너구리에서 광견병 항체가를 조사한 결과 ONRAB을 살포한 지역에서의 너구리는 51%의 양성을 RABORAL VRG를 살포한 지역에서는 38%의 양성을 확인한 결과가 발표되었다. 따라서 국내에서 광견병 미끼백신에 대한 수입을 다변화할 필요가 있다. 캐나다에서 생산한 ONRAB 미끼백신도 수입하여 살포하는 것도 검토하여야 할 필요가 있다.



그림 69. 미끼백신을 살포한 지역에서 광견병 미끼백신의 내용물만 남은 경우

4) 광견병 재발생시 광견병 방역대책 수립

가) 동물의 백신접종 의무화

동물에서 광견병을 예방하기 위한 가장 좋은 수단은 대량백신접종인 것은 잘 알려진 사실이다. 그림 70에 나타난 것처럼, 개에 광견병 접종을 위해 매년 140만두를 공급하고 있고, 지속적으로 공급할 필요가 있다.

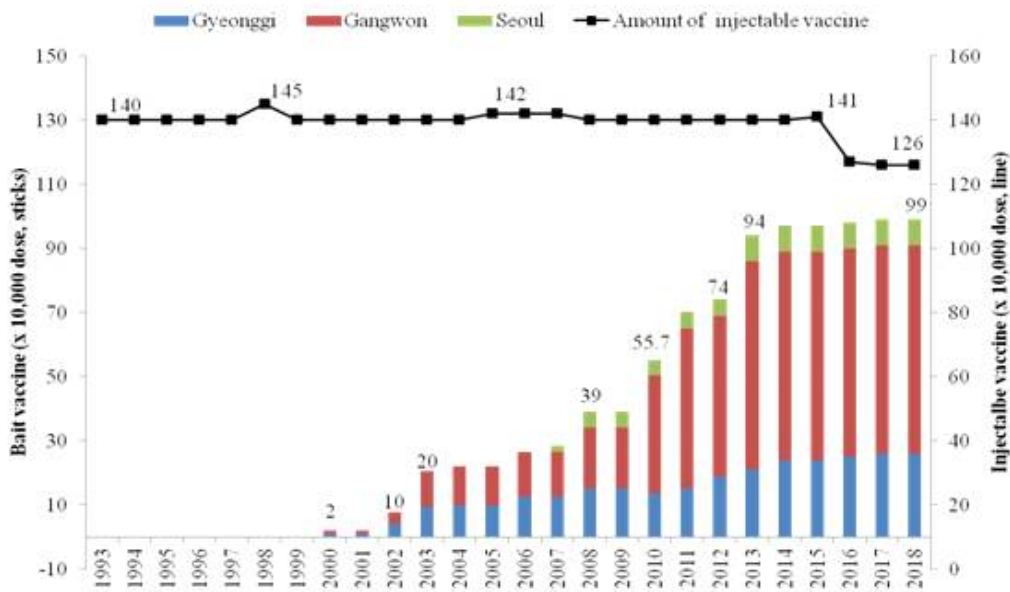


그림 70. 1993년 이후 광견병 주사용 백신공급량과 미끼백신 살포량

대량백신은 기술적 그리고 규정적인 측면을 만족시킨다. OIE에서는 광견병 백신을 규정된 량의 면역항원을 포함하는 표준화된 형성물을 백신으로 정의하고 있다. 광견병백신은 phylogroup 1에 속한 모든 광견병 변이주에 대하여 방어효력을 발휘한 것으로 알려졌다. 대한민국에서 광견병의 백신의 허가사항은 표 42와 같다. 5개 제조사에서 광견병 생백신을 생산하고 있으며, 6개의 광견병불활화백신이 수입 또는 국내에서 제조하고 있고, 2종의 미끼백신이 허가되어 있으나, VRG백신이 수입되고 있는 상황이다. OIE에서는 세포에서 증식하고, 불활화한 부형제가 포함된 백신 혹은 재조합광견병 벡터백신을 권고하고 있다. 광견병 생백신은 ERA strain이 너구리에서 광견병을 일으킨 보고가 있어서 캐나다에서는 더 이상 사용하고 있지 않다. 한국에서는 1980년 이후로 개에서 사용하고 있는 ERA strain은 더 이상 사용하지 않고 보다 안전한 ERAGS strain으로 교체할 필요가 있다. 광견병이 재발생 하였을 경우 발생지역 반경 10 km의 동물은 모두 광견병 백신접종을 의무화 한다.

표 45. 한국에서 상용화되어 있는 광견병 백신들

Produced by	Type of vaccine	Dose/route	For use in animals
Korea BNP	Live	1 mL/ IM	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Daesung micro	Live	1 mL/ IM	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Greencross	Live	1 mL/ IM	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Komipharm	Live	1 mL/ IM	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Choongang vac	Live	1 mL/ IM	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Merial Inc	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cattle
Zoetis(Nobivac)	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cat
Virbac	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cat
Choongang vac	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cat, cattle
Zoetis(Diffensor)	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cat, cattle, sheep
Komipharm	Inactivated	1 mL/ IM or SC	Dog, cattle, horse, sheep, goat
Virbac	Bait	2 mL/ Oral	Raccoon dog, badger, fox
Merial Inc	Bait	1.8 mL/Oral	Raccoon dog

규정적인 측면으로 한국의 중앙정부는 광견병 백신의 비용을 지방정부에 보조함으로써 국가광견병 근절프로그램을 유지하고 있다. 지방정부는 중앙에서 할당한 예산에 추가하여 3-4월 그리고 9월-10월에 백신접종을 실시하고 있다. 모든 개가 3개월령에 도달하였을 때 광견병 백신을 접종하여야 한다. 그러므로 백신접종시기를 한정하지 않고 연중 백신을 접종토록 조정할 필요가 있다. 위험지역에 있는 개와 소 그리고 위험지역에 있지 않는 개도 백신을 접종하여야 하며, 동물의 소유주의 협조가 필요하다. 2014년 유기동물을 방지하고 소유주의 책임성을 증대시키기 위해서 동물복지법은 동물등록제를 시행하였다. 현재 3개월령 이상의 개에 한정하여 등록하도록 되어 있는데 반려묘, 페렛, 너구리까지 확대시켜야 할 필요가 있다. 반려동물을 등록하는 장치로는 내장형 마이크로칩과 외장형 표시 등이 있다. 동물에도 광견병에 감수성이 있는 동물이 많이 있다. 동물원내에 있는 아프리카 civet이 광견병에 감염된 보고가 있다. 따라서 광견병이 동물원내 동물에 감염되면 다른 감수성동물에 광견병의 전파될 위험이 상당히 크다. 그러므로 동물원내 동물도 광견병 불활화백신을 접종하거나, 미끼백신을 적용하는 것이 필요하다.

나) 너구리를 위한 광견병 미끼백신의 살포

너구리 매개 광견병이 1993년에 확인된 이후 1998년도에 68건이 발생함에 따라 대한민국 정부는 2000년도에 경기도와 강원도 지역에 광견병 미끼백신을 살포하기 시작하였다. 그림 3에 보는 것과 같이 미끼백신의량은 점차 증가하여 2018년도에 99만 두분을 살포하였다. 표 1에서 보는 것과 같이 2002년도에 광견병 건수가 78건에 달하였다가 점차 감소하여 2014년도에 발생하지 않았다. 따라서 미끼백신이 한국에

서도 서유럽에서처럼 효과가 있는 것으로 추정할 수 있다. 2013년 2월이 4년 이상 동안 광견병의 발생이 없음에도 불구하고 광견병의 위험은 늘 상존하고 있다. 광견병이 발생한 지역에 미끼백신을 살포하고 있음에도 불구하고 광견병 위험지역 지정이나 해제의 고려 없이 미끼백신을 살포하고 있다. 미끼백신의 살포 방법을 개선할 필요가 있다. 현재는 너구리가 살고 있는 지역을 잘 알고 있는 사람이 가축농장 주위에 미끼백신을 살포하였다. 그러나 이 방법은 많은 사람이 동원되어야 하고 야생의 너구리에게 적절하게 살포되지 않을 수 있다. 따라서 헬기를 이용한 살포방법도 좋은 대안이라 할 수 있다. 비무장지대의 10km 주변지역을 광견병 완충지역으로 설정하고 미끼백신을 지속적으로 살포하는 것이다. 한국에서 분리된 광견병 바이러스의 근연관계를 확인한 결과 중국의 북동부, 러시아에서 분리된 바이러스와 상동성이 높았기 때문에 언제든지 광견병이 북한을 통해 전파될 수 있다. 가까운 미래에 비무장지대의 광견병에 감염된 동물이 남쪽으로 이동할 수도 있다. 이러한 이유에서 북한에 협력적인 과제를 제안하여 북한쪽의 비무장지대에 미끼백신을 살포하는 것을 고려해야 한다. 광견병이 재발한 지역에 긴급하게 반경 10 km내에 미끼백신을 살포한다.

다) 광견병 조사의 강화

광견병의 조사는 광견병 근절프로그램에서 가장 중요한 부분이다. 대한민국에서 수행하고 있는 광견병 조사는 수동적 조사이다. 즉 광견병에 의심되는 동물이 발견되었을 때 시도 동물시험소에 진단을 위해 의뢰되는 형태이다. 광견병 위험지역에서의 강화된 조사는 일반지역에서 수동적 조사와 함께 광견병 비발생 상태를 유지하는데 중요하다. 활동적 조사에서 야생 너구리, 경비견, 사냥개와 같은 동물은 지속적으로 조사하여야 한다. 죽은 동물을 포함한 많은 의심축은 야생동물구조센터와 한국도로공사로부터 수집할 수 있다. 일반적으로 동물시험소 내에서 광견병 검사가 이루어지는데 시험소 내에서 동물을 취급하는 사람은 공수병 백신을 접종받아야 하며, 직접형광항체법, 조직학적 확인, 유전자 증폭법(RT-PCR)을 숙지하여야 한다. 시험소에서 근무하는 직원의 이동이 잦기 때문에 광견병 진단에 관한 정기적인 훈련프로그램을 운용할 필요가 있다.

라) 신속한 보고체계

동물이 극심한 공격적 행동, 마비와 같은 신경증상을 나타냈을 때 광견병은 임상적으로 진단이 가능하다. 그러나 광견병에 의심되는 동물을 여러 가지 시험을 실시하지 않고 임상적으로만 광견병을 진단하기에는 쉽지 않다. 그러므로 광견병은 바이러스 혈증을 나타내지 않기 때문에 뇌조직에서 광견병 바이러스를 증명해야 한다. 야생 너구리를 포함한 동물이 광견병에 의심되었을 때 빠르게 지역 동물시험소에 연락하는 것이 바람직하다. 현재 대한민국에는 13개의 야생동물구조센터에서 야생동물을 치료하고 있기 때문에 이러한 광견병 의심축을 발견하기 쉽다. 그러므로 야생동물구조센터와 동물시험소간의 협력이 필요하여, 의심축을 빨리 보고하였을 때 2차 발생의 위험을 줄일 수 있다.

마) 백신접종 후 혈청학적 조사

광견병 위험지역내의 개와 소에 백신을 접종하는 것이 의무적으로 명시하고 있음에도 불구하고 보정이 어렵거나, 너무 어린나이, 주인의 거절, 주인의 부재, 임신, 질병과 같은 다양한 이유로 몇몇 동물은 백신을 접종받지 못하고 있다. 대량색신의 효능을 평가하기 위하여 광견병 많이 발생하는 지역에서는 혈청학적 조사를 실시하고 있다. 이러한 혈청조사는 동물의 전체적인 면역상태를 모니터링하고 재발을 방지하는데 중요하다. 대한민국에서는 2002년부터 경기도 및 강원도에 21개 시군의 개와 소에 대하여 혈청검사를 수행하여 왔다. 항체 양성률이 70이하인 시군에 대하여 재백신을 권고하고 있다. 이러한 정책인 광견병 재발방지를 위해 유지되어야 한다. 동물의 혈액을 수집하는 것과 관련하여 동물의 혈청이 얻어지는 지역은 광견병 위험지역으로 표시하여야 한다. 광견병 위험지역의 지정과 해제에 관하여 광견병이 10년 동안 발생하지 않으면 광견병 위험지역에서 해제하여 일반지역으로 지정하고, 광견병이 발생하면 즉시 위험지역으로 설정하여 백신을 접종한 후 1개월에 혈청조사를 실시하는 것이 바람직하다.

바) 유기동물 관리와 증성화 프로그램

아시아 지역의 많은 나라에서 유기견에 의해서 광견병이 전파하고 있다. 유기견 수의 증가는 광견병 발생의 위험을 증가시킨다. 표 2에서 보는 것과 같이 광견병에 감염된 너구리와 접촉을 갖는 것으로 추정되는 고양이에서 광견병이 확인되었다. 소유주가 개나 고양이를 버렸을 경우나 길을 잃은 경우에 유기견이 발생한다. 그러므로 소유주는 유기견 수를 줄이기 위해서 높은 수준의 책임성을 가져야 한다. 현재 3개월령 강아지는 동물 등록제에 등록하도록 되어 있는데 3개월령 이상의 고양이도 추가적으로 등록해야 할 필요가 있다. 가축전염병예방법에 따르면 유기동물이 전염성질병에 감염되었다고 의심되는 경우 포획하여 살처분 될 수 있다, 하지만 유기견의 살처분은 광견병 근절에 효과가 없다고 증명되었다. 유기견수를 줄일수 있는 다른 방법은 증성화프로그램에 연결시키는 것이다. 이 제도는 2014년도부터 모든 시군에서 시행하고 있다. 증성화 프로그램을 진행하는 동안에 유기 고양이에 백신을 접종하였을 때 면역반응이 유도되었다고 보고하고 있다. 이러한 프로그램은 유기견에 적용할 필요가 있다.

사) 외국으로부터 광견병 유입방지

사람과 반려동물의 이동이 증가하고 너구리와 페릿과 같은 야생동물의 수입이 매년 증가되고 있는데 이러한 수입 동물의 증가는 광견병에 감염된 동물의 유입을 증가시킬 수 있다. 영국의 경우 광견병의 유입을 막기 위해 검역, pet travel scheme, EU pet movement policy를 적용하고 있다. 따라서 대한민국도 수입동물의 검역을 강화할 필요가 있다. OIE의 국제육상건강코드에서 광견병 항체가가 0.5 IU/ml이상인 개와 고양이가 한국으로 수입될 수 있다. 최근에 중국의 족제비 오소리가 대만에서 장기간 광견병의 숙주로 확인되었다. 그러므로 아시아의 족제비 오소리 수입시 더욱 철저한 검역이 요구된다. 그리고 외국에서 수입되는 야생동물도 광견병 항체가를 확인해야 하며, 국제기준 이상인 경우 허용되어야 한다.

아) 결론

대한민국은 대량백신접종, 미끼백신의 살포를 포함한 광견병 근절프로그램을 성공적으로 수행하여 2013년 2월 이후에 광견병의 비발생을 유지하고 있다. 이러한 활동은 아시아지역의 좋은 모델이 될 것이다. 광견병 청정국을 공식적으로 선언하기 전에 OIE에서 요구하는 사항을 살펴 광견병 청정국 지위를 획득해야 할 것이다.

5) 야생동물에서 분리한 세균의 기탁

다양한 야생동물에서 채취한 50개의 시료에서 혈액배지에서 세균의 분리를 시도하였다. 그림 66와 표 46에서 보는 것과 같이 최종 39개 세균을 분리 동정하였다. 분리세균으로는 Acinetobacter 3종, Aeromonas 4종, Enterobacter 2종, Enterococcus 1종, Escherichia 6종, Gallibacterium 1종, Klebsiella 3종, Kurthia 1종, Lelliottia 1종, Lysinibacillus 1종, Micrococcus 1종, Pseudomonas 1종, Psychrobacter 3종, Raoultella 1종, Rothia 1종, Staphylococcus 9종으로 확인하고 한국수의유전자은행에 기탁하였다.

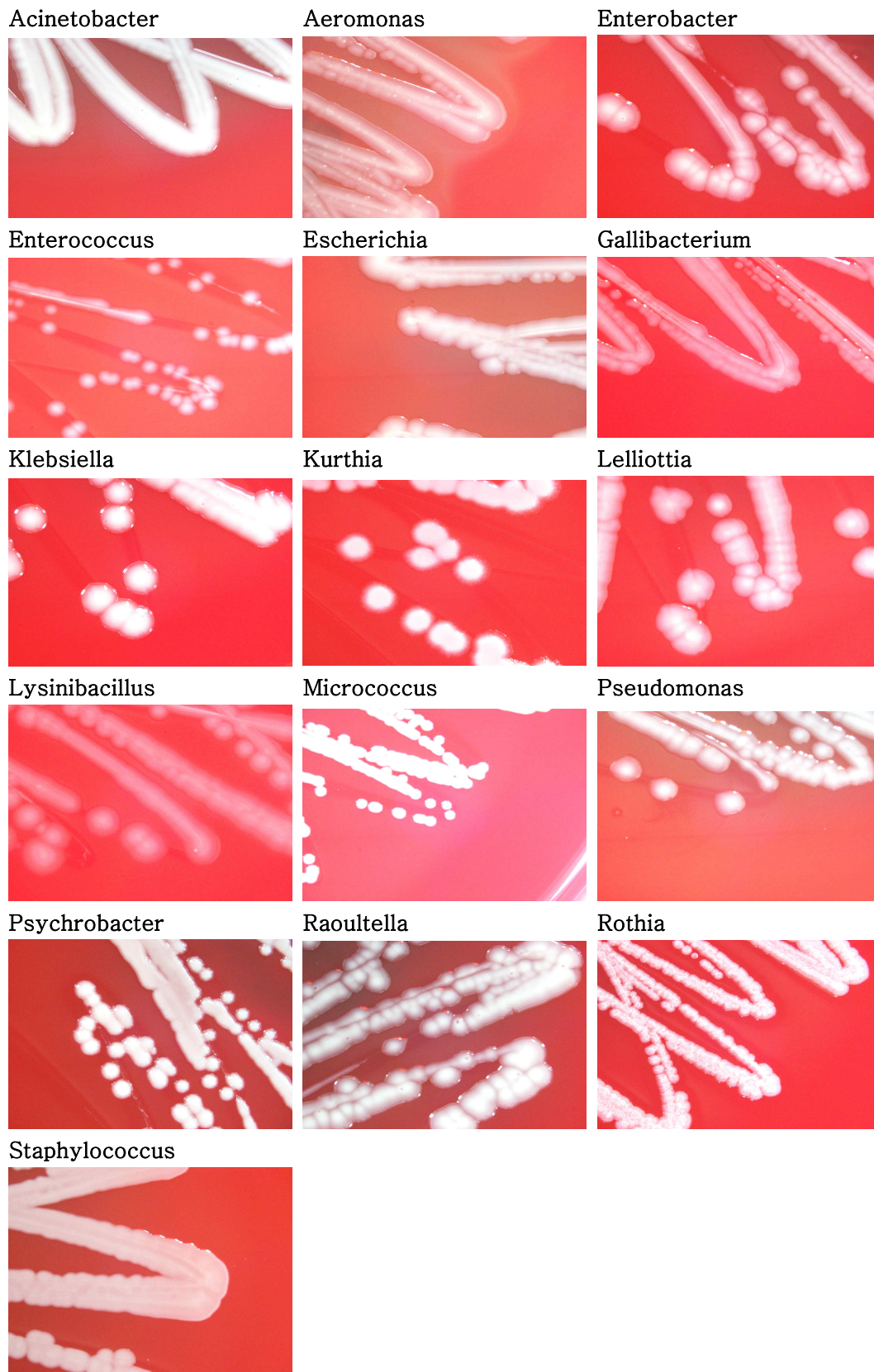


그림 71. 야생동물에서 분리 동정한 세균 16종

표 46. 야생동물 시료에서 분리한 세균목록

번호	속종	시료번호	채취부위	균주명
1	수리부엉이	8-174M-1	구강	<i>Psychrobacter arenosus</i>
2	수리부엉이	8-174C-1	총배설강	<i>Psychrobacter arenosus</i>
3	수리부엉이	8-174C-2	총배설강	<i>Escherichia fergusonii</i>
4	청솔모	8-509-1	-	<i>Enterobacter ludwigii</i>
5	고라니유수	8-510N-2	비강	<i>Staphylococcus sciuri</i>
6	고라니유수	8-510R-1	직장내	<i>Aeromonas jandaei</i>
7	고라니유수	8-510R-2	직장내	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
8	고라니유수	8-517N-1	비강	<i>Kurthia zopfii</i>
9	고라니유수	8-531N-1	비강	<i>Aeromonas hydrophila</i>
10	고라니유수	8-537N-1	비강	<i>Acinetobacter pittii</i>
11	고라니유수	8-537N-2	비강	<i>Aeromonas hydrophila</i>
12	너구리유수	8-540N-1	비강	<i>Staphylococcus sciuri</i>
13	너구리유수	8-540N-2	비강	<i>Escherichia fergusonii</i>
14	고라니	8-544N-1	비강	<i>Micrococcus luteus</i>
15	고라니	8-544N-2	비강	<i>Staphylococcus sciuri</i>
16	고라니	8-544A-1	항문	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
17	오소리	8-546N-1	비강	<i>Klebsiella oxytoca</i>
18	오소리	8-546N-2	비강	<i>Lelliottia nimipressuralis</i>
19	오소리	8-546A-2	항문	<i>Klebsiella oxytoca</i>
20	오소리	8-547N-1	비강	<i>Staphylococcus delphini</i>
21	오소리	8-547A-2	항문	<i>Enterobacter aerogenes</i>
22	고라니유수	8-557N-1	비강	<i>Aeromonas veronii</i>
23	고라니유수	8-557R-1	직장	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
24	고라니	8-558R-1	직장	<i>Escherichia fergusonii</i>
25	고라니	8-558R-2	직장	<i>Escherichia fergusonii</i>
26	고라니	8-563N-1	비강	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
27	고라니	8-563N-2	비강	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
28	청둥오리	8-566M-1	구강	<i>Rothia nasimurium</i>
29	청둥오리	8-566M-2	구강	<i>Enterococcus faecalis</i>
30	청둥오리	8-566C-1	배설강	<i>Psychrobacter faecalis</i>
31	청둥오리	8-566C-2	배설강	<i>Escherichia fergusonii</i>
32	멧비둘기	8-577M-1	구강	<i>Pseudomonas knackmussii</i>
33	멧비둘기	8-577C-1	총배설강	<i>Escherichia fergusonii</i>
34	멧비둘기	8-577C-2	총배설강	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
35	호반새	8-588M-1	구강	<i>Staphylococcus sciuri</i>
36	호반새	8-588A-2	항문	<i>Staphylococcus sciuri</i>
37	집비둘기	8-597M-1	구강	<i>Staphylococcus sciuri</i>
38	집비둘기	8-597M-2	구강	<i>Gallibacterium genom</i>
39	집비둘기	8-598A-2	항문	<i>Staphylococcus kloosii</i>



농림축산검역본부



수신 내부일자
(경유)

제목 수의유전자원 기탁 신청

1. 관련: 가축전염병 병원체 등 수의유전자원 관리규정(농림축산검역본부 고시 제2016-13호, 2016.02.17.).
2. 농림식품기술기획평가원에서 지원하는 연구사업 중 아래의 연구 과제(계 2 협동) 수행에 따른 결과로 야생동물의 시료에서 분리된 수의유전자원(세균 39주)을 불임과 같이 기탁합니다.

과제번호	구분	과제명	과제 참여기관 및 책임자
2016-269	총괄	광견병 미끼백신 싼포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감염되는 조기검정 기법 개발	위코원 바이오텍/ 남동석
	계2협동	광견병 미끼백신 싼포지역의 항체 모니터링을 위한 포획 너구리에서의 광견병 항체가 검사 및 광견병 발생정보 분석	농림축산검역본부/ 양동균

불임, 기탁관련 서류(야생동물 16S rRNA 39주). 끝.

수의연구원 유재영 바이오스일넷 바이오스일넷 2018.8.22
 과수의연구원 양동균 과장 조만수

참조자

3. 연구개발 성과

가. 목표성과

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발과제의 목표 성과는 2차년도 까지 특허출원 2건, 제품화 6건, 논문(비SCI) 3건, 정책활용 2건임

나. 연구 개발 성과

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발과제를 통해 발생한 연구 성과는 특허출원 2건, 미생물 자원 품종등록 60건, 기술실시 1건, 제품화 6건, 고용창출 1건, 기술인증(동물용 체외진단 시약허가/수출용) 6건, 논문(비SCI) 3건, 학술발표 1건, 정책활용 2건임 (표 47)

표 47. 목표성과 및 연구개발 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표					기타 (다 연구 활용 등)			
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성		정책활용 · 홍보		
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문					학술 발표	정책 활용	홍보
												SCI	비 SCI						
최종목표	2					6							3				2		
1차년도			21											1					
2차년도	2		39	1		6			1		6		3	1			2		
소 계	2		60			6							3	2			2		
종료 1차 년도			21										1	1					
종료 2차 년도	2		39	1		6			1		6		2	1			2		
소 계	2		60	1		6			1		6		3	1			2		
합 계	2		60	1		6			1		6		3	1			2		

1) 지식 재산권

가) 특허출원

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 과제를 통해 개발된 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법과 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 이상 2건에 대해 특허 출원을 진행함. 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법은 실시간 유전자 증폭기법 기반의 Rabies virus/ERAGS 백신주, Rabies virus/VRG 백신주, Rabies virus/Ad0910_G 백신주 감별방

법에 대한 특허 출원이고, 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법은 유전자 증폭기법 기반의 Rabies virus/ERAGS 백신주, Rabies virus/VRG 백신주, Rabies virus/Ad0910_G 백신주 감별방법에 대한 특허 출원임. (그림 72-73)

출원번호통지서	페이지 1 / 3
<p>관인생략 출원번호통지서</p>	
출원일자	2018.08.29
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2018-0102213 (접수번호 1-1-2018-0859413-81)
출원인명칭	주식회사 코젠바이오텍(1-2000-032069-6)
대리인성명	이원희(9-1998-000385-9)
발명자성명	남용석 김수복 김진혁 곽별이
발명의명칭	광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브, 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법
<p>특 허 청 장</p> <p><< 안내 >></p>	
<ol style="list-style-type: none"> 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), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 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 [전자적교관허가서(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. 중립원이 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 72. 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 특허출원 정보

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2018.08.29
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2018-0102226 (접수번호 1-1-2018-0859474-55)
 출원인명칭 주식회사 코젠바이오텍(1-2000-032069-6)
 대리인성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자성명 남용석 김수복 김진혁 곽별이
 발명의명칭 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법

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 등불된 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(경장), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 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 [전자적교원허가서(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. 종업원이 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 73. 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 특허출원 정보

나) 미생물 자원 품종등록

다양한 야생동물에서 채취한 50개의 시료에서 혈액배지에서 세균의 분리를 시도하였다. 1차년도 21개, 2차년도 39개 총 60개의 세균을 분리 동정함. 분리된 세균은 염기

서열분석을 통해 확인한 후 한국수의유전자은행에 기탁함.

표 48. 미생물 자원 품종등록 리스트


No.	등록/기탁번호	생명자원 명	등록/기탁기관	등록년차
1	BA1700042	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	1차년도
2	BA1700050	<i>Macrocococcus caseolyticus</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
3	BA1700045	<i>Macrocococcus caseolyticus</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
4	BA1700051	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
5	BA1700031	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
6	BA1700033	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
7	BA1700037	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
8	BA1700039	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
9	BA1700044	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
10	BA1700048	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
11	BA1700040	<i>Corynebacterium falsenii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
12	BA1700049	<i>Oceanobacillus massiliensis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
13	BA1700032	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
14	BA1700035	<i>Microcococcus luteus</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
15	BA1700034	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
16	BA1700036	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
17	BA1700043	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
18	BA1700046	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
19	BA1700047	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
20	BA1700038	<i>Vagococcus lutrae</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
21	BA1700041	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
22	BA1800463	<i>Aeromonas veronii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	2차년도
23	BA1800464	<i>Lysinbacillus fusiformis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
24	BA1800465	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
25	BA1800466	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
26	BA1800467	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
27	BA1800468	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
28	BA1800469	<i>Rothia nasimurium</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
29	BA1800470	<i>Enterococcus faecalis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
30	BA1800471	<i>Psychrobacter faecalis</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
31	BA1800472	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
32	BA1800473	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
33	BA1800474	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
34	BA1800475	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
35	BA1800476	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	
36	BA1800477	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자은행 (KVCC)	

37	BA1800478	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
38	BA1800479	<i>Gallibacterium genomosp</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
39	BA1800462	<i>Enterobacter aerogenes</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
40	BA1800461	<i>Staphylococcus delphini</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
41	BA1800460	<i>Klebsiella oxytoca</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
42	BA1800459	<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
43	BA1800458	<i>Klebsiella oxytoca</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
44	BA1800457	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
45	BA1800456	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
46	BA1800455	<i>Micrococcus sp</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
47	BA1800454	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
48	BA1800453	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
49	BA1800452	<i>Aeromonas hydrophila</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
50	BA1800451	<i>Acinetobacter pittii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
51	BA1800480	<i>Staphylococcus kloosii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
52	BA1800449	<i>Kurthia zopfii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
53	BA1800448	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
54	BA1800447	<i>Aeromonas jandaei</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
55	BA1800446	<i>Staphylococcus sciuri</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
56	BA1800445	<i>Enterobacter ludwigi</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
57	BA1800444	<i>Escherichia fergusonii</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
58	BA1800443	<i>Psychrobacter arenosus</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
59	BA1800442	<i>Psychrobacter arenosus</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)
60	BA1800450	<i>Aeromonas hydrophila</i>	한국수의유전자원은행 (KVCC)


2) 기술실시

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발과제를 통해 개발된 기술의 직접 실시를 통해 제품을 개발하고자 출원된 특허를 기반으로 자체기술이전을 진행함. 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법과 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 이상 2건의 특허 출원된 기술을 8년 동안 사용하고 해당 기술료로 5,138,000원을 납부함.

농림식품 과학기술을 선도하자



농림식품기술기획평가원



수신자 (주)코젠바이오텍대표이사
(경유)
제목 기술료 감면 승인 알림((주)코젠바이오텍)

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 기술료 감면 신청(KB180928_01(2018.9.28.)호)과 관련됩니다.

3. 귀 기관에서 요청한 기술료 감면 건에 대해 아래와 같이 승인하오니 불임의 후속 조치 사항을 참조하시어 기술실시보고서 제출 및 기술료 납부에 차질이 없도록 진행해 주시기 바랍니다.

가. 승인내역

사업명	과제명	주관연구기관/ 실시기업	정부출연금	당초기술료	최종 기술료
가축 질병	광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발	코젠바이오텍/ 코젠바이오텍	367,000천원	36,700천원	5,138천원 (중소기업 80% 감면, 일시납 추가감면 30%)

나. 계좌내역

- 은행명 및 계좌번호 : 신한은행, 56212694560640
- 예금주 : 농림식품기술기획평가원

다. 기술실시 이후 제출 서류 및 기한

- 기술실시보고서(감면승인 통보 후 3개월 이내), 전문기관에 납부한 기술료 입금증
- 영리법인이 전문기관에 일시납 한 경우, 기술료 징수 및 사용현황 보고서를 별도 작성할 필요 없음

불 임. 농식품 R&D 과제 기술실시 계약 체결 후 조치사항 1부. 끝.

그림 74. 과제를 통해 개발된 기술을 이용한 제품개발을 위한 자체 기술실시 계약 체결

3) 사업화

가) 제품화

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 과제를 통해 개발된 기술을 기반으로 총 6개의 제품을 개발함. 특히 출원된 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 프로브 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 기반으로 Real-time PCR Kit 3종을 제품화 하였고, 광견병 바이러스 및 백신주를 감별하기 위한 프라이머 및 이를 이용한 광견병 바이러스 및 백신주의 감별방법 기반으로 conventional PCR Kit 3종을 제품화 함. (표 49)

표 49. 과제를 통해 개발된 6종의 키트 정보 및 외관

#	구분	관리 번호	품명	모양	
				외부	내부
1	qPCR	R0852	PowerChek™ Rabies Virus / ERAGS Real-time PCR Kit		
2		R0853	PowerChek™ Rabies Virus / VRG Real-time PCR Kit		
3		R0854	PowerChek™ Rabies Virus / Ad0910_G Real-time PCR Kit		
4	cPCR	P0822	PowerChek™ Rabies Virus / ERAGS Detection Kit		
5		P0823	PowerChek™ Rabies Virus / VRG Detection PCR Kit		
6		P0824	PowerChek™ Rabies Virus / Ad0910_G Detection PCR Kit		

나) 고용창출

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발과 제 진행 중 기존 인력이었던 문명진 대리의 퇴사로 발생될 수 있는 업무 공백을 방지하기 위해 이재승 대리를 고용함. (표 50)

표 50. 과제를 통해 발생된 고용창출 현황

#	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	이재승	(주)코젠바이오텍	2017-07-03	정규직

4) 기술인증

가) 동물용 체외진단시약 허가(수출용) 확보

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발과 제를 통해 개발된 6종의 제품에 대한 동물용 체외진단시약 허가(수출용)를 확보함. (표 51)

표 51. 과제를 통해 개발된 6종의 키트에 대한 동물용 체외진단시약 허가(수출용) 정보

#	구분	관리번호	품명	허가번호
1	qPCR	R0852	PowerChek™ Rabies Virus / ERAGS Real-time PCR Kit	제 136-038 호
2		R0853	PowerChek™ Rabies Virus / VRG Real-time PCR Kit	제 136-039 호
3		R0854	PowerChek™ Rabies Virus / Ad0910_G Real-time PCR Kit	제 136-040 호
4	cPCR	P0822	PowerChek™ Rabies Virus / ERAGS Detection Kit	제 136-041 호
5		P0823	PowerChek™ Rabies Virus / VRG Detection PCR Kit	제 136-042 호
6		P0824	PowerChek™ Rabies Virus / Ad0910_G Detection PCR Kit	제 136-043 호

5) 학술성과

가) 논문

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 과제 진행 중 해당 과제 내용을 이용해 총 3편의 논문을 발표함. 발표된 학술지는 Clinical and Experimental Vaccine Research (CEVR), Korean journal of veterinary research, Clinical and experimental vaccine research 임. (표 52)

표 52. 과제를 통해 발표된 3종의 논문에 대한 정보

#	학술지명	논문명	주저자명	출판일자
1	Clinical and Experimental Vaccine Research (CEVR)	Mass vaccination has led to the elimination of rabies since 2014 in south korea	Dong-Kun Yang	2017-07-01
2	Korean journal of veterinary research	Detection of viral infections in wild Korean raccoon dogs (Nyctereutesprocyonoideskoreensis)	Dong-Kun Yang	2017-12-04
3	Clinical and experimental vaccine research	Strategies to maintain Korea's animal rabies non-occurrence status	Dong-Kun Yang	2018-07-31

나) 학술발표

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 과제 진행 중 해당 과제 내용을 이용해 2건의 학술발표를 진행 함. (표 53)

표 53. 과제를 통해 진행 된 학술발표에 대한 정보

#	학술회의명	발표제목	발표자	발표일
1	대한수의학회 춘계학술심포지움	Preventive measures of rabies and molecular epidemiological analysis of rabies in south korea	양동군	2017-04-28
2	대한수의학회 추계학술심포지움	What viral infections are detected and exposed in wild Korean raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides koreensis)?	양동군, 김하현, 이승현, 김종택, 조인수	2017-10-27

6) 정책활용·홍보

가) 정책건의

광견병 미끼백신 살포지역의 항체 모니터링 및 백신과 감별되는 조기검정 기법 개발 과제 진행 중 광견병 예방을 위해 사용되는 미끼백신의 효율적인 살포방법 및 광견병 발생지역의 효율적인 관리방안에 대한 정책제안을 진행함. (표 54)

표 54. 과제를 통해 제안한 정책건의 내용 및 정보

#	정책활용상태	시책명	주관부처	일자	기대효과
1	정책건의	광견병 백신과 관련한 동물보호법 시행령 개정 건의	농림축산식품부	2018-04-13	<ul style="list-style-type: none"> - 동물보호법 개정을 통해 동물등록시 예방접종 여부를 확인토록 하여 광견병백신 접종률 향상을 기대할 수 있음 - 동물보호법 상의 등록 대상을 고양이까지 확대하여 해당 개체에 대한 관리를 개선할 수 있을 것으로 기대됨
2	정책건의	광견병 위험지역, 완충지역의 지정 및 미끼백신 살포방법 개선	농림축산식품부	2018-04-13	<ul style="list-style-type: none"> - 광견병 미끼백신의 수급조절은 광견병 위험지역의 지정과 해제 및 buffer zone에 따라서 유연하게 되어 제한된 예산을 절감할 수 있음 - 미끼백신의 살포방법을 다변화함으로써 지정된 지역을 지정된 수량만큼 신속하게 살포될 것으로 기대됨

다. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	약 2억원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	0.01	0.1	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0	5
		국외	0	0	1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	국내 및 해외 수요처의 요청에 따라 기 개발된 기술을 응용한 파생상 품을 개발할 가능성 있음				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	0	0.2	
	수 출	0	0	0.05	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 최종목표

- 광견병 전파 너구리 임상검사(100두/년 이상)
- 실시간 유전자 진단법 기반 광견병 유전자 진단법 3건 개발
- 유전자 진단법 기반 광견병 유전자 진단법 3건 개발
- 분석적 민감도 $10^2 \sim 10^1$ copies/ μ l 이하
- 정밀도 CV value < 5%

나. 연구성과

- 특허출원 2건
- 제품화 6건
- 비SCI 논문 3건
- 정책활용 2건

3-2. 목표 달성여부

최종목표 및 연구성과 그리고 목표로 설정되지 않았으나 본 과제를 통해 발생한 성과는 표 55와 같음. 최초 계획했던 최종목표와 연구성과의 모든 항목이 달성된 것을 확인할 수 있음.

표 55. 최종목표 및 목표 달성도

#	구분	항목	1차년도	2차년도	최종	목표대비 달성률	목표 달성 여부
1	최종 목표	광견병 전파 너구리 임상검사(100두/년 이상)	106두 (너구리및 기타)	107두 (너구리및 기타)	213두	107%	목표 달성
2		실시간 유전자 진단법 기반 광견병 유전자 진단법 3건 개발	3건	-	3건	100%	목표 달성
3		유전자 진단법 기반 광견병 유전자 진단법 3건	-	3건	3건	100%	목표 달성
4		분석적 민감도 $10^2 \sim 10^1$ copies/ul	모두 10^1 이하	모두 10^1 이하	6건	100%	목표 달성
5		분석적 특이도: 목표 대상에서만 특이적으로 반응	모두 특이적으로 반응	모두 특이적으로 반응	6건	100%	목표 달성
6		정밀도: CV value <5%	모두 5% 이하	-	3건	100%	목표 달성
7	연구 성과	특허출원 2건	-	2건	2건	100%	목표 달성
8		제품화 6건	-	6건	6건	100%	목표 달성
9		논문 비SCI 3건	2건	1건	3건	100%	목표 달성
10		정책활용 2건	-	2건	2건	100%	목표 달성
11	추가 성과	품종등록 미생물 자원 60건	21건	39건	60건	-	추가 달성
12		고용창출 1건	-	1건	1건	-	추가 달성
13		학술발표 2건	1건	1건	2건	-	추가 달성
14		동물용 체외진단시약허가 (수출용) 6건	-	6건	6건	-	추가 달성
15		기술실시 1건	-	1건	1건	-	추가 달성

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)
최종 목표 및 연구성과의 모든 항목을 달성함

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 동물용 체외진단시약 허가 확보

- 국내에서 동물용 체외진단시약을 판매하기 위한 동물용 체외진단시약허가 확보 필요함
- 동물용 체외진단시약허가 확보를 위해 임상수행 필요
- 임상 수행을 위한 시료 확보를 위해 농림축산검역본부와의 협의 필요

나. 국내 국외 수요처의 요청에 따른 파생상품 개발

본 과제를 통해 개발된 제품 이외에 본 과제를 통해 생성된 시스템을 응용한 파생상품 개발 요청 발생 시 해당 제품의 성능평가 및 제품화 예정

다. 해외 전시회 참가시 제품 진열 및 적극적인 홍보 진행

국내 시장 및 해외시장의 적극적인 마케팅을 위해 국내 및 해외 전시회 참석 시 본 과제를 통해 만들어진 키트의 전시 및 홍보 진행 예정

라. 효율적인 광견병 관리 방안 제시

- 정책건의를 통해 기존의 관리방법의 문제점을 개선할 수 있는 효율적인 관리방안 제시
- 광견병의 효율적인 관리를 통해 궁극적으로 광견병 비발생국 선포

붙임. 참고문헌

- 1) Outbreaks and Control of Animal Rabies in Korea, Kyoung Ki Lee, Infect Chemother, 2010;42(1):1-5
- 2) Study on the Outbreak and Prevention of Wildlife Diseases, Jeong Yeon Yi, National Institute of Environmental Research, 2006-56-838
- 3) Man bites dog: a new rabies antidote could save 55,000 lives per year, Matt Stroud, The verge, Jul 2, 2013
- 4) Mass vaccination has led to the elimination of rabies since 2014 in South Korea, Dong-Kun Yang, Clin Exp Vaccine Res., 2017 Jul;6(2):111-119
- 5) EDUCATE, VACCINATE, ELIMINATE: Achieving zero human deaths from dogtransmitted rabies by 2030, WHO, OIE, FAO, Joint Statement, 28 September 2016
- 6) WHO Expert Consultation on Rabies, WHO, WHO Technical Report Series 982
- 7) 재조합 광견병 바이러스, 이를 포함하는 광견병 예방용 백신 조성물 및 야외 광견병 바이러스와의 감별을 위한 멀티플렉스 RT-PCR, 양동균, 공개특허공보, 10-2015-0138956
- 8) 동물질병 표준진단 요령, 농림축산검역본부, 2015