

316042  
-03

개  
인  
플  
루  
엔  
자  
바  
이  
러  
스  
의

인  
수  
공  
통  
감  
염  
병

대  
응

제  
어  
기  
술

개  
발

최  
종  
보  
고  
서

2019

농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부

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

발  
간  
등  
록  
번  
호

11-1543000-002668-01

# 개 인 플 루 엔 자 바 이 러 스 의 인 수 공 통 감 염 병 대 응 제 어 기 술 개 발 최 종 보 고 서

2019.02.14.

주관연구기관 / (주)메디안디노스틱  
협동연구기관 / 한국생명공학연구원  
협동연구기관 / 고려대학교산학협력단  
위탁연구기관 / 연세대학교산학협력단  
위탁연구기관 / 고려대학교산학협력단  
위탁연구기관 / (주)녹십자수의약품

## 농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<보고서 요약서>

**보고서 요약서**

과제고유번호	316042-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.05.19.~ 2018.12.31	단 계 구 분	(3)/(3)
연구사업명	단 위 사 업	가축질병대응기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	개 인플루엔자 바이러스의 인수공통감염병 대응 제어기술 개발			
연구책임자	오 진 식	해당단계 참여연구원 수	총: 28 명 내부: 7 명 외부: 21 명	해당단계 연구개발비	정부: 270,000천원 민간: 90,000천원 계: 360,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 28 명 내부: 7 명 외부: 21 명	총 연구개발비	정부: 810,000천원 민간: 270,000천원 계: 1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메디안디노스틱			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 고려대학교산학협력단 /연세대학교산학 협력단 / (주)녹십자수의약품			연구책임자: 함 승 주/송 대 섭/문 형 준	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

<제출문>

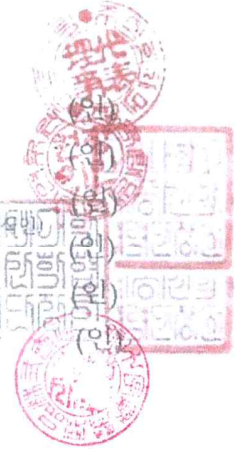
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “개 인플루엔자 바이러스의 인수공통감염병 대응 제어기술 개발”  
(개발기간 : 2016 . 05 . 19 ~ 2018 . 12 . 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 14 .

주관연구기관명 : (주)메디안디노스틱 (대표자) 오 진 식  
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김 장 성  
                  : 고려대학교산학협력단 (대표자) 고 제 상  
위탁기관명 : 연세대학교산학협력단 (대표자) 이 원  
                  : 고려대학교산학협력단 (대표자) 고 제 상  
                  :(주)녹십자수의약품 (대표자) 김 승 복



주관연구책임자 : 오 진 식  
협동연구책임자 : 윤 선 우 / 김 정 기  
위탁기관책임자 : 함 승 주 / 송 대 섭 / 문 형 준

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

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개 인플루엔자 바이러스 감시체계 구축을 통한 신규 분리주 분리                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 동물병원, 유기동물보호소, 생가축시장 등을 대상으로 혈청학적 검사 수반 반려동물 유래 인플루엔자 감시체계 확립</li> <li>: 국외(태국, 중국, 베트남 등) 협력 연구팀과의 감시 역학 공조체계 확립</li> <li>: 반려동물 유래 인플루엔자 바이러스 분리 및 분리주에 대한 특성 분석: 유전학적 특성, 병리생물학적 특성, 재조합성, 중간전염성 등</li> <li>: 반려동물 유래 재조합 또는 돌연변이 인플루엔자 바이러스 분리 및 분리주에 대한 특성 규명</li> </ul> </li> <li>○ 개 인플루엔자 백신 항체 및 감염 항체 구분용 진단키트 개발                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 백신측과 감염측 항체를 구분하는 항체진단을 통해 개 인플루엔자 감염여부를 판단</li> <li>: NS1 단백질을 이용한 항체측정용 ELISA 및 신속진단 감별키트의 개발</li> <li>: 감염 항체 진단 ELISA 키트 [민감도 100%(n=20), 특이도 92.9%(n=70)], Rapid 키트 [민감도 90%(n=20), 특이도 92.9%(n=70)], total 항체 진단 ELISA 키트 [민감도 93.3%(n=75), 특이도 100%(n=70)], Rapid 키트 [민감도 96%(n=75), 특이도 94.3%(n=70)]의 개발</li> </ul> </li> <li>○ 범용 개 인플루엔자 바이러스 백신 개발 및 유효성 안전성 평가                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: Reverse genetics 와 Bioinformatics 기반 항원소변이, 대변이에 효능이 확보된 개 인플루엔자 H3N2 바이러스에 대한 범용 백신 후보물질 선정, 생산 및 정제 최적의 조건 확립</li> <li>: 범용 백신 후보물질의 유효성 검증 (아형 비특이적 교차 면역유도능 분석)</li> <li>: 목적동물에서의 백신 안전성 및 면역원성 검증</li> <li>: 기술이전 및 산업화를 위한 백신 후보물질 대량 생산 시스템 구축</li> <li>: 대량생산 백신 후보물질의 안전성 및 유효성 검증</li> </ul> </li> <li>○ 효과적인 개 인플루엔자 백신 범용 나노전달체 시스템 아쥬번트 개발                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 생분해성 고분자 합성 기술을 이용 나노전달체 시스템 구축</li> <li>: 개 인플루엔자 바이러스 범용 나노전달체 스크리닝</li> <li>: 범용 나노전달체 시스템 아쥬번트를 활용한 백신 개발</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개 인플루엔자 감시체계 확립 및 신규 바이러스 라이브러리 구축</li> <li>○ 개 인플루엔자 DIVA 진단키트 개발 및 시제품 산업화</li> <li>○ 범용 개 인플루엔자 백신용 항원 단백질 확보와 백신 시제품 제작 및 산업화 추진</li> <li>○ 나노기반 생분해성 개 인플루엔자 백신 아쥬번트 개발</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신규 개 인플루엔자 바이러스 분리 라이브러리를 이용한 인플루엔자 변이 양상 예측</li> <li>○ DIVA 및 ELISA진단 시스템을 활용한 개 인플루엔자 바이러스의 인수공통 위해성 사전 통제</li> <li>○ 개 인플루엔자 범용 백신 및 개량 아쥬번트를 개발함으로써 국내 백신 기술의 경쟁력 증진에 기여</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	개 인플루엔자	재조합 단백질	범용 백신	인수공통감염병	중간전파
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	canine influenza	recombinant protein	universal vaccine	zoonotic disease	interspecies transmission

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	8
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	67
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	69
붙임. 참고 문헌 .....	69

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

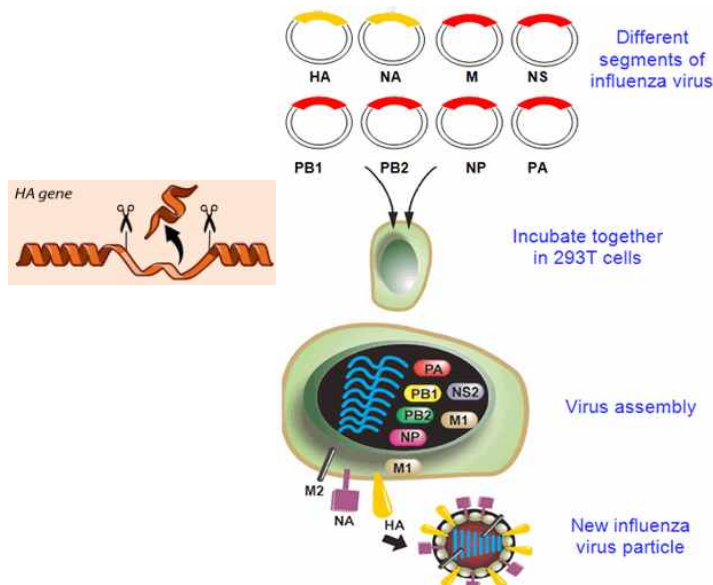
## 가. 연구개발 목적

- (1) 2006 이후 발견된 조류유래의 인플루엔자 바이러스 H3N2에 의한 개 인플루엔자 바이러스가 급성의 호흡기 증상을 나타냈으며, 애완견에서 발생한 개 인플루엔자 바이러스는 비병원성 조류인플루엔자가 애완견에 감염되어 심각한 호흡기 질환을 일으킨 것으로 지금까지 알려진 개 인플루엔자 바이러스 H3N8과는 다른 아형으로, 종간의 벽을 극복하여 감염된 것으로 주목을 받고 있음. 최근 연구 논문들을 분석해보면 기존의 개 인플루엔자 바이러스와 2009년 판데믹 H1N1형 인플루엔자 바이러스 유전자 재조합된 변종 인플루엔자 바이러스가 발견되고 있음을 확인 할 수 있으며, 기존의 개 인플루엔자 바이러스보다 병원성 및 전파성이 증가되고 있음이 보고되고 있음
- (2) 현재 개 인플루엔자 바이러스가 사람에게 직접 전파된다는 연구결과는 보고되고 있지 않은 상황이지만, 개도 다양한 인플루엔자 바이러스 재조합이 가능하기 때문에 다양한 신·변종 개 인플루엔자 바이러스의 감염을 예방을 하기 위해 범용 개 인플루엔자 백신 개발이 필요한 상황임.
- (3) 개에서의 인플루엔자에 의한 급성의 호흡기 질환을 예방하기 위해서 뿐만이 아니라, 인플루엔자 전염에 있어서 중간전파의 매개체가 되는 것을 예방하고, 신종 또는 변종 개 인플루엔자 바이러스의 재조합 가능성을 유발하는 mixing vessel이 야기되는 것을 방지하기 하여 안전하고 건강한 반려견 문화가 지속될 것으로 예상됨.
- (4) 기존의 아형특이적인 개 인플루엔자 바이러스 백신은 현재 다양한 인플루엔자 바이러스가 반려견에서 발견되고 있는 상황이기 때문에 이를 예방할 수 있는 범용 개 인플루엔자 바이러스 백신이 개발된다면 아형 비특이적 개 인플루엔자 바이러스 발생 시 신속한 대처 백신 개발과 생산을 통해 기존 백신의 한계를 극복할 수 있을 것으로 예상됨
- (5) 기존 상용화 백신에 의해 유도되는 혈액내 항체들로 인해 H3N2 백신개발 전까지 H3N2 감염항체를 구분할 수 없는 실정이며, 지속적인 변이 가능성이 존재하기 때문에 백신항체와 감염항체를 감별할 수 있는 DIVA(Differentiation of infected and vaccinated animals) 진단시스템 구축이 절실함
- (6) 현재 미국 내에서 상용화되고 있는 개 인플루엔자 바이러스 백신은 H3N8 아형 특이적인 불활화 백신으로 2015년에 창궐했던 H3N2 바이러스에 대해서는 예방효과가 없었음. 범용 개 인플루엔자 바이러스의 백신 개발은 기존의 아형특이적인 백신의 단점을 극복할 수 있을 것으로 예상되며, 반려견에서의 다양한 인플루엔자 감염을 예방하여 양견 산업에 경제적인 피해를 줄일 수 있을 것으로 예상됨.
- (7) 해마다 전 세계적으로 개 인플루엔자 바이러스가 창궐하고 있어서 백신의 수요가 점점 증가할 것으로 예상되기 때문에 동물 백신 산업의 활성화로 경제적 부가가치 창출이 증대될 것으로 예상됨.
- (8) 범용성 백신 개발의 산업화 기술은 전 세계적으로 유행하는 고병원성 인플루엔자 바이러스에 대한 다양한 백신 기술에 이용하여 다양한 유전자변이 바이러스에 대해 공통적으로 예방효과를 유도할 수 있을 것으로 판단됨. 또한, 다양한 항원을 기반으로 한 범용 백신 연구로 상용 백신의 단점을 극복하고 다양한 아형의 바이러스에 대응할 수 있는 인체용 범용 백신 개발 연구에 기여함.

- (9) 높은 돌연변이와 새로운 아형, 중간 감염의 잠재능력을 갖고 있는 인플루엔자 바이러스에 효과적으로 대응하기 위해 새로운 바이러스 아형에 대한 연구와 정보 공유로 인플루엔자 팬더믹에 대응에 적용 가능

## 나. 연구개발의 필요성

- (1) 신규 개 인플루엔자 바이러스 백신 개발 필요성
- (가) 현재 국내외 개 인플루엔자 백신은 한국의 “캐니플루” (주)바이오노트와 미국 (Merk Animal Health)에서 “Nobivac® Canine Flu H3N8”의 개 인플루엔자 백신이 상용화되어있으며, 이 두 백신들은 모두 야생 분리주를 불활화한 백신임
  - (나) 특정 타입의 개 바이러스에만 백신이 존재함. 따라서 신종 개 인플루엔자 발생 시 그 효과를 기대할 수 없을 뿐 아니라 현재 백신 개발 시스템은 바이러스의 감염능에 따라 백신 생산효율이 좌우될 수 있음
  - (다) 새로운 항원에 대한 신속하고 효율적인 백신생산 기술이 필요함
- (2) 역유전학(reverse genetics)기반 백신 개발 필요성
- (가) 역유전학(reverse genetics)기술을 이용함으로써 임의적으로 바이러스의 복제 능력을 향상시켜 높은 역가의 바이러스를 단기간 내에 만들어낼 수 있음
  - (나) 백신생산에 있어 신기술로 주목되는 reverse genetics system을 이용한 백신 생산 기술을 확보함으로써 기존 바이러스 및 새로운 바이러스에 대한 효율적인 백신생산이 가능함
  - (다) 유전적 변이를 첨가할 수 있기 때문에 고병원성의 바이러스의 경우라도 저병원성의 바이러스로의 전환이 가능함
  - (라) 새로운 변형 바이러스가 출현 시, 직접 바이러스를 분리하지 않고도 유전자 분석 결과만을 가지고도 유전자 변형을 통해 빠르게 백신을 준비 할 수 있음



역유전학(reverse genetics)을 이용한 바이러스 생산

- (3) 개 인플루엔자 백신 항체 및 감염 항체 구분용 진단키트 병행 개발
- (가) 개 인플루엔자는 항원검사법과 항체검사법을 통해 진단할 수 있음. 항원 검사법의 경



우 RT-PCR과 같은 유전자 진단과 효소면역측정법 (ELISA) 또는 현장진단테스트 (POCT, point-of-care-test) 등과 같은 항원항체반응을 이용한 면역학적 진단으로 분류될 수 있음. RT-PCR과 항원항체반응을 이용한 항원검사법의 경우 감염초기에는 개 인플루엔자 바이러스 검출이 가능하지만 감염 후 3일 ~ 4일이 지나면서 검출률이 낮아지며, 그 이후에는 검출되지 않는 것으로 알려져 있음. 감염 7일 이후에는 혈액 내 항체가 형성되기 때문에 항체검사가 바람직하지만, 상용화되어있는 백신을 접종할 경우 유발되는 항체와 야외감염에 의해 유발되는 항체를 구분할 수 있는 진단키트가 상용화된 바 없어 개 인플루엔자 감염 감시체계상 백신 및 감염항체 스크리닝에 문제점이 있음. 백신에 의한 항체와 야외감염에 의한 항체를 구분함으로써 항원진단을 통해 감별할 수 없는 시기의 개 인플루엔자 감염여부를 판단 할 수 있으며, 이를 통해 바이러스의 전파를 최소화하면서 감염 동물의 치료, 격리, 등 효율적이며 시기적절한 조치를 취할 수 있을 것으로 사료됨.

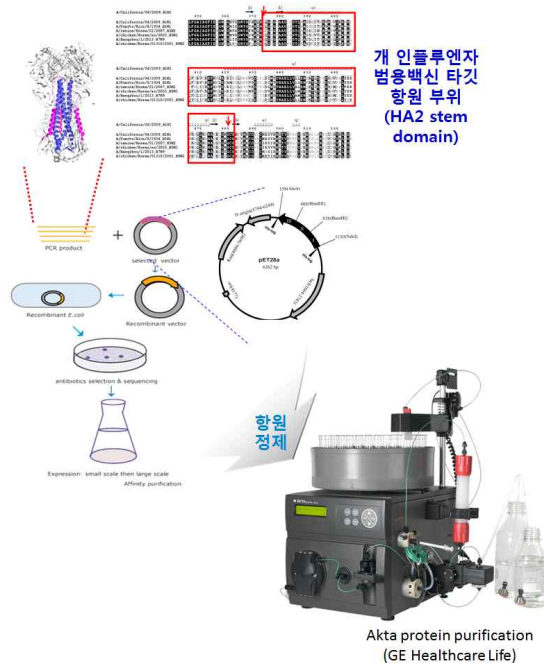
## 다. 연구개발 범위

- (1) 본 연구는 기존의 국내 및 국외 상용화되고 있는 아형 특이적인 개 인플루엔자 바이러스 백신의 한계를 극복하기 위한 범용 개 인플루엔자 백신 개발임. 재조합 단백질 발현 (대장균, 배큘로바이러스, Mammalian suspension cell)시스템을 이용하여, 면역원성과 생산 효율이 우수한 바이러스 단백질을 가공 생산
- (2) 전량 수입에 의존하고있는 아췌번트를 개량하여 우수한 국내 Nano 기술을 이용한 면역 증강 아췌번트를 개인플루엔자 바이러스 백신에 응용
- (3) 기존 상용화 백신의 한계를 극복하기 위해 개 인플루엔자 바이러스에 범용 예방 백신 개발을 위해 다양한 재조합 단백질 생산 시스템을 활용하여 유용한 백신용 항원 개발.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

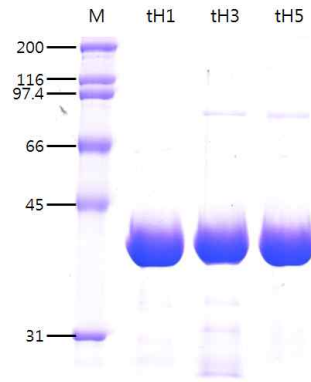
### 가. 범용 백신 후보 물질 개발 및 유효성 검증

- (1) His-tag affinity와 친화크로마토그래피 (gel filtration chromatography)를 이용한 최적의 정제시스템 구축
- (가) 1차년도에 선별된 범용백신 타깃 항원을 대장균 발현 시스템(pET28a 벡터)을 활용하여 재조합 항원 단백질 발현의 최적화를 바탕으로 2차년도에서는 백신용 항원으로 사용하기 위한 고순도 재조합 항원 단백질 정제 최적화 시스템 구축을 수행하였음.
- (나) 다양한 범용 백신 타깃 항원을 대장균 발현벡터에 삽입 후 배양함. 세포 배양 후 IPTG를 이용하여 낮은 온도(18도)에서 16~18시간 induction 후, 세포를 원심 분리하여 모음. 배양세포 파쇄 후 상층액에 포함된 단백질은 His-tag affinity와 친화크로마토그래피법과 gel filtration chromatography법을 Akta Prime purification system을 이용하여 순도가 높은 단백질 분획을 확보하였음.
- (다) 먼저 His-tag affinity와 친화크로마토그래피(Ni-NTA agarose)법을 이용하여, 순도가 높은 항원을 정제하고, 발현된 단백질은 재조합 단백질 정제법에 가장 많이 사용되고 있는 Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) agarose colume을 사용하였음



[고순도 단백질 백신후보물질 정제 시스템 개요]

- (라) 정제된 단백질 중 순도가 높은 단백질 분획은 Akta Prime protein purification system (GE Healthcare Life)을 이용하여 고순도 재조합 항원 단백질을 확보하였음.
- (마) 정제된 순도가 높은 재조합 단백질 백신용 항원은 SDS-PAGE와 coomassie blue 염색법을 이용하여 각각의 분획된 정제된 HA 단백질을 육안으로 확인하였음.

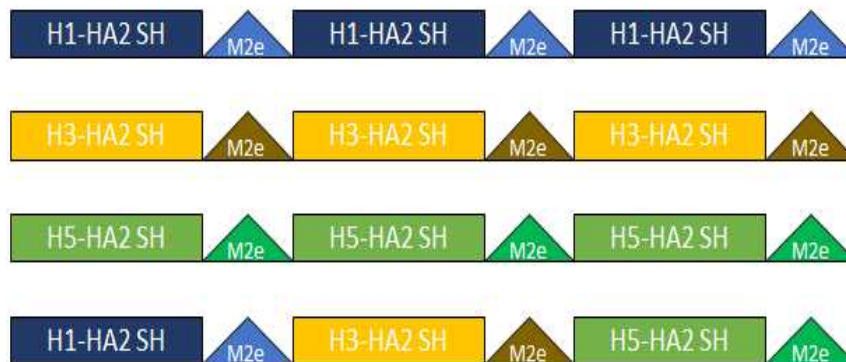


[고순도 개 인플루엔자 범용백신용 HA 항원 생산]

(바) 단백질 정량은 bradford assay와 표준 단백질로 알려진 BSA(bovine serum albumin) 단백질을 정제된 단백질을 이용하여 타깃 항원의 정량적인 분석도 수행함

(2) 신규 3XHA2SH-M2e 범용 백신 후보물질 제작 및 효능평가

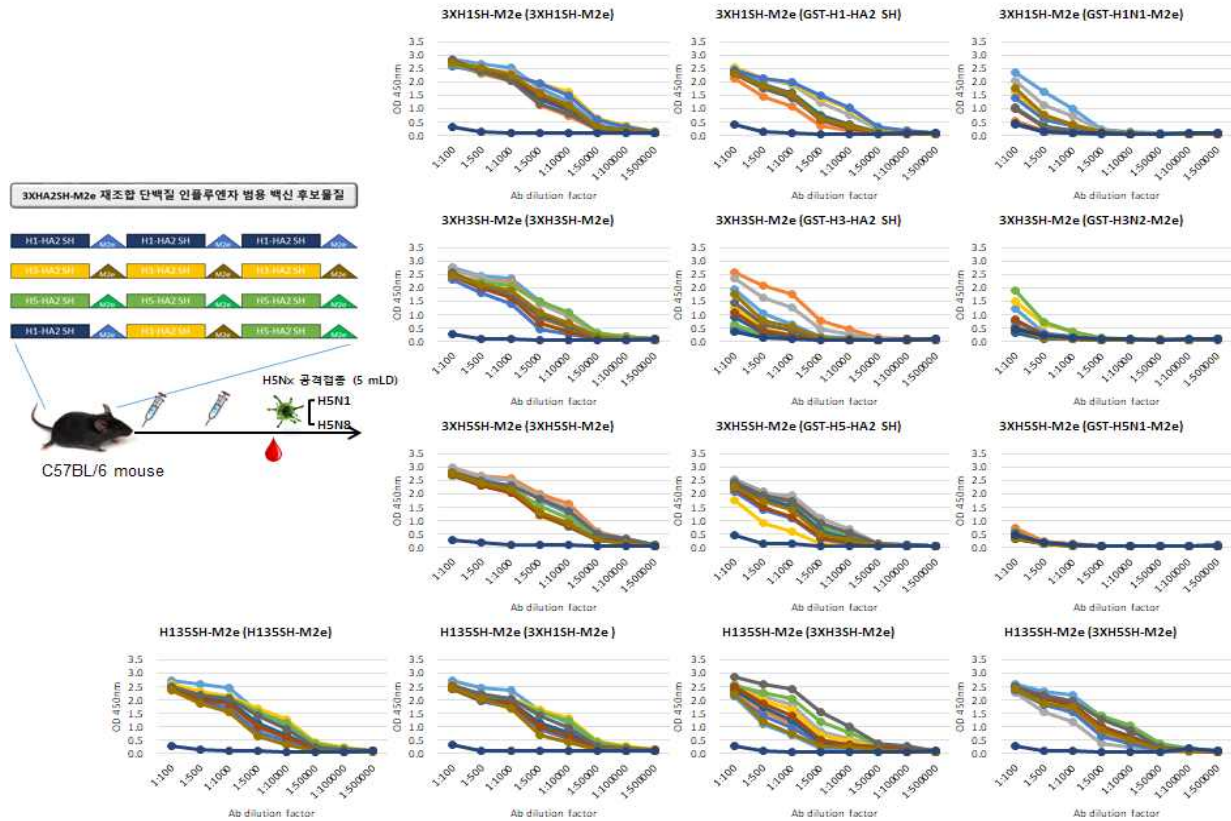
(가) 항체 생성능과 방어 면역 효능이 확인된 HA2 SH를 기반으로 백신 효능 및 범용성 강화를 위해 M2e protein의 ectodomain peptide 링커를 삽입한 삼중합(triplet repeat) 재조합 단백질 백신 후보물질을 디자인 제작 및 확보함



[HA2의 short Helix와 범용백신 주요 타겟인 M2e펩타이드를 접목한 삼중합체 재조합 단백질 백신제작]

(나) 신규 범용백신 후보물질의 항체 생성능과 백신 효능 검증을 위해 소동물 모델(마우스)에서의 면역실험을 시행함.

- ① 다양한 아형(H1, H3, H5)과 서로 다른 세 아형을 모두 포함하는 3XHA2SH-M2e 단백질을 대장균 발현 시스템을 이용하여 발현, 정제하여 확보하였음.
- ② 정제된 재조합 단백질 50ug/mouse과 ISA 71 adjuvant를 혼합하여 C57BL/6 (6wks, female) 마우스에 2주 간격으로 2회 근육주사를 시행함.
- ③ 백신 접종 4주 후에 채취한 혈액에서 ELISA 기법을 이용하여 항체 생성능을 분석하였으며, 각각의 항원들이 해당 아형에 특이적인 항체 생성능을 확인하였음.
- ④ 생성된 항체가 서로 다른 다양한 subtype의 바이러스도 인식할 수 있음을 확인 할 수 있었음.

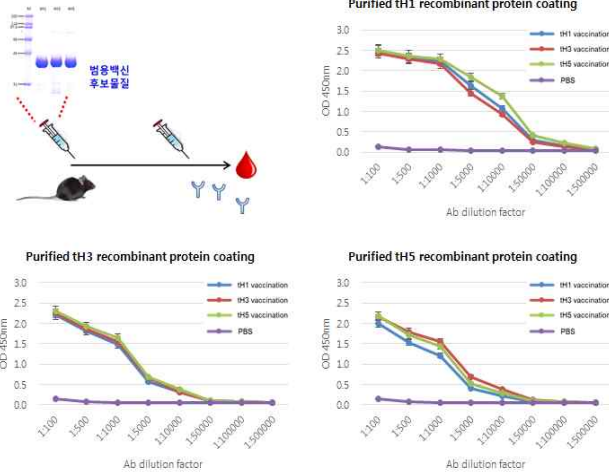


[3XHA2SH-M2e 백신 후보물질들의 마우스 면역 후 항체 형성능 확인]

- ⑤ 세 아형을 혼합한 H135SH-M2e 항원의 경우, 세 종의 아형 모두에 대한 항체 생성능을 보였음.
- ⑥ 또한, 3XHA2SH-M2e 항원에 대한 항체 뿐만 아니라 항원을 구성하고 있는 HA2 SH와 M2e domain 각 부분에 대해서도 각각에 대한 항체 형성능을 확인할 수 있었음.

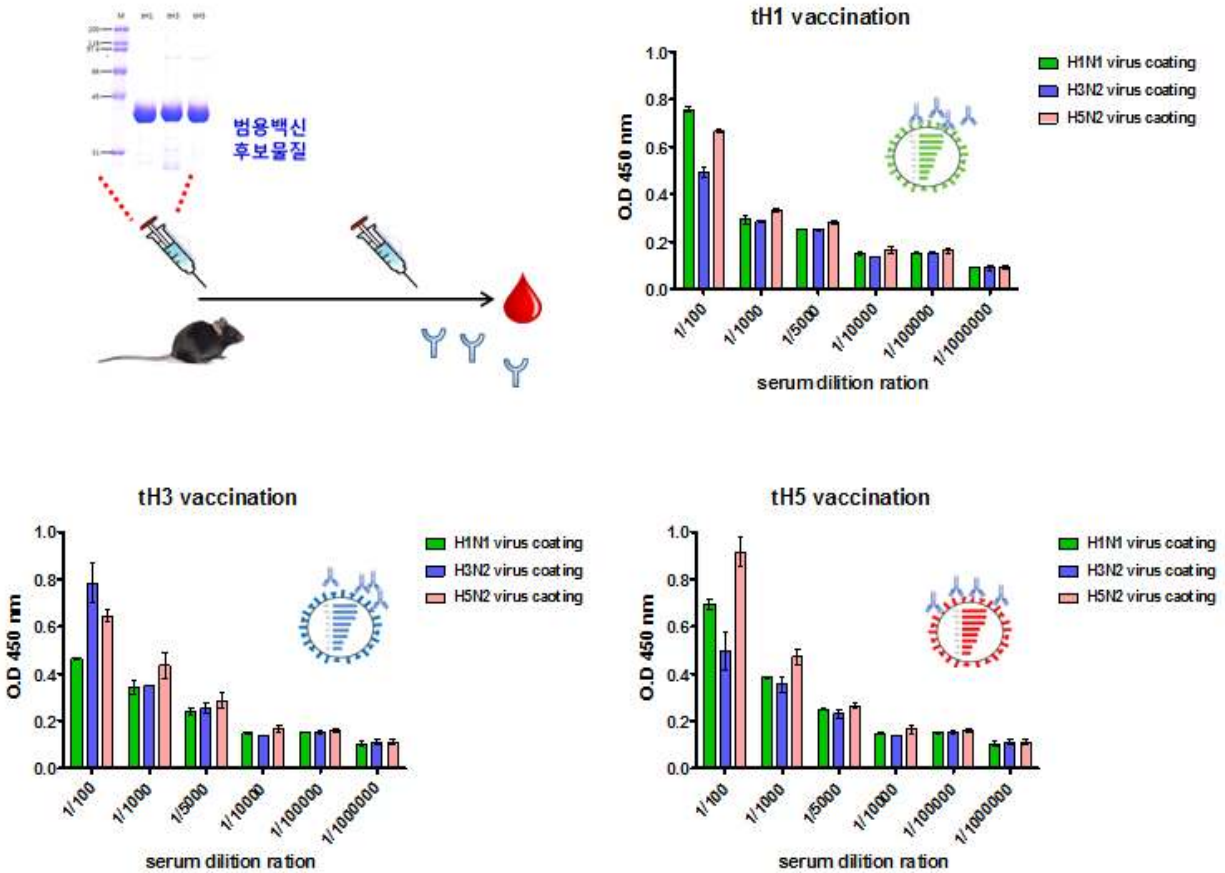
(3) 범용 백신 후보 물질의 유효성 검증 (교차 면역유도능 분석)

- (가) 개 인플루엔자 범용 진단용 후보물질의 항체 생성능 평가를 위해 C57BL/6 (6 wks, female) 마우스를 이용하여 재조합 단백질을 10 ug/mouse과 ISA 71 백신 면역보강제를 혼합하여 근육에 2주 간격으로 총 2 회 주사하였음.
- (나) 2차 백신 접종 후에 혈액에서 혈장을 분리하여 ELISA 기법을 이용하여 항원특이적인 항체생성능 및 교차면역 항체생성능을 분석하였음.



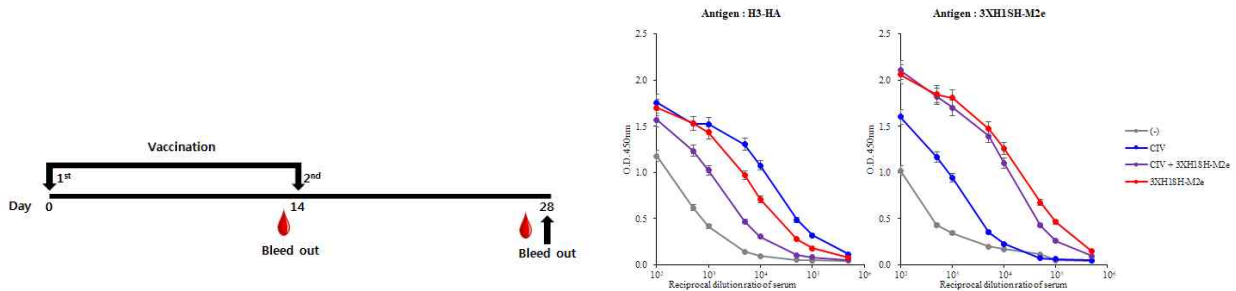
[재조합 항원 단백질을 이용한 기반 개 인플루엔자 범용백신 교차면역능 분석]

(다) 고순도 재조합 단백질 백신후보물질의 면역원성 및 교차면역능 분석은 H1N1, H3N2, H5N2 바이러스를 정제 및 약독화하여 coating antigen으로 사용하였고, ELISA 기법을 이용하여 항체와 바이러스의 결합능을 분석하였음.



[정제된 바이러스를 이용한 개 인플루엔자 범용백신 교차면역능 분석]

- (라) 유용항원이 접종 기간 동안 실험동물의 체중감소와 생존을 변화가 없는 것을 확인함으로써 백신 안정성도 확인 할 수 있었음.
- (마) 중동물 모델(개)을 이용한 3XH1SH-M2e 범용백신 후보물질 면역원성 평가 및 공격 접종
  - ① 다양한 아형에 대한 범용 인플루엔자 백신으로의 적용을 넘어서 다양한 동물 종에 대한 범용 인플루엔자 백신으로의 적용 가능성을 평가

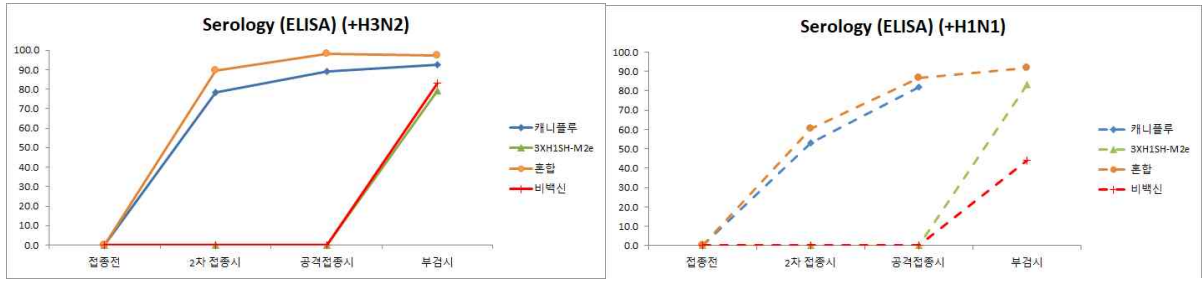


[중동물 모델(개)을 이용한 3XH1SH-M2e 범용백신 후보물질 면역원성 평가]

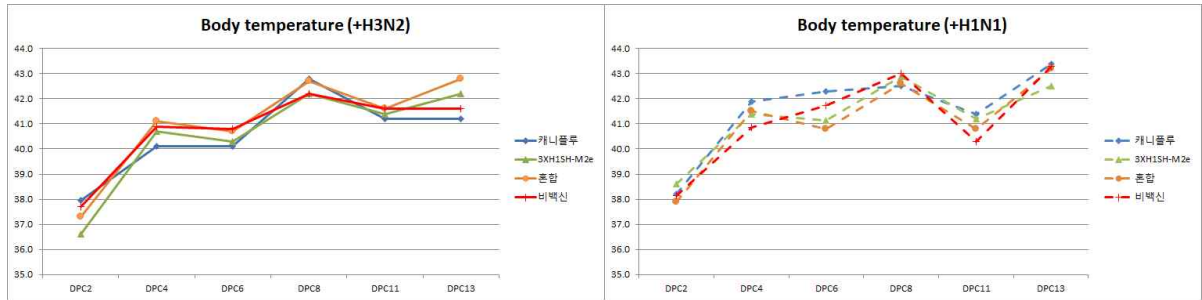
- ② 소동물 모델(마우스)에서 면역원성과 범용 방어 면역 능력 유도가 확인된 3XH1SH-M2e 범용백신 후보물질의 중동물 모델(개)에서의 면역원성 평가를 위한 실험을 국립베트남농과대학의 Dr. Phan 교수팀과 연계하여 수행함.
- ③ 3XH1SH-M2e 단백질 범용백신 후보물질 500ug/dog과 ISA 51 VG adjuvant를 1:1(v/v)로 혼합하여 중동물 모델(개)에 2주 간격으로 2회 근육주사를 시행함.
- ④ ELISA 결과에서 알 수 있듯이, 백신 접종에 사용한 3XH1SH-M2e 후보물질 항원에 대한 특이적인 항체 생성이 유도됨을 확인할 수 있었음.

## 나. In-vivo 실험을 통한 범용항원의 효능 확인

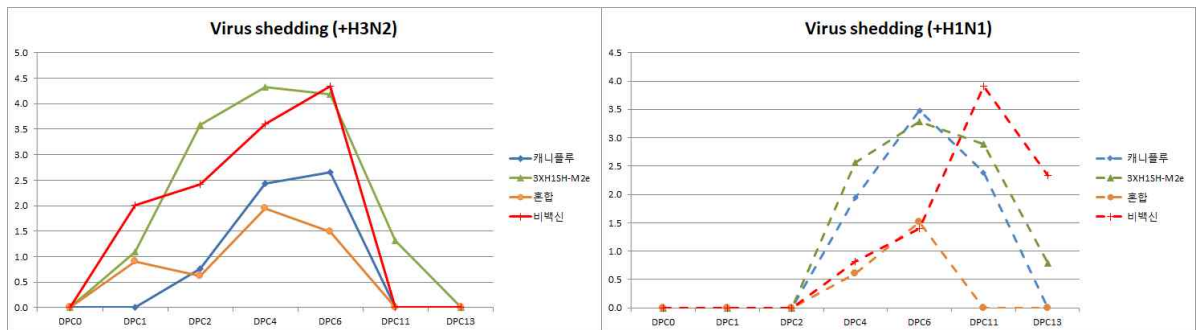
- (1) 목적동물(비글)에 다양한 시험백신(formulation)접종 후 공격접종에 따른 방어효과 확인
  - (가) 3종의 시험백신(범용항원, 범용항원+CIV, 상용백신) 준비
    - ① 9주령 Beagle dog을 준비하여 각 시험백신별로 4마리씩 2주 간격으로 2회 마리당 1mL씩 근육접종
    - ② 2차 백신 2주째 각 시험백신군을 다시 2개 그룹으로 나누어 CIV H3N2와 pH1N1을 각각 비강으로 공격접종
    - ③ 백신접종전, 1차 백신 2주후, 2차 백신 2주후에 채혈하여 ELISA항체가 측정
    - ④ 공격접종 후 2주간 체온, 비강통한 바이러스배출, 2주째 안락사하여 폐조직 변화 관찰
  - (나) 1차백신 2주째부터 항체가 상승 확인



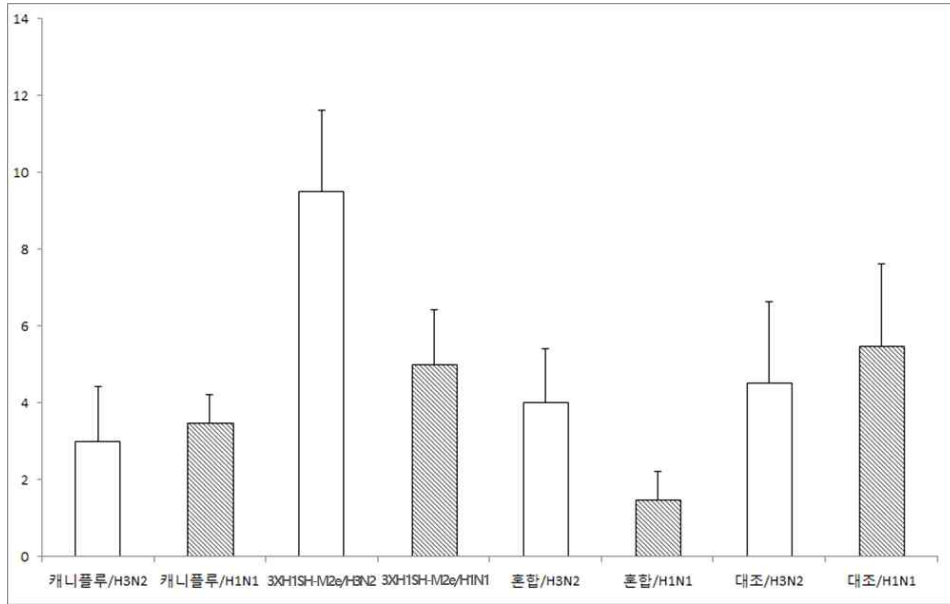
(다) 공격 접종 후 시험군에 관계없이 다소간의 차이는 있으나 체온 상승 확인



(라) 공격접종 후 비강을 통한 바이러스 배출은 H3N2의 경우, 상용백신군과 범용항원+CIV 군에서 배출량과 기간이 감소하였으며, H1N1의 경우, 범용항원+CIV군에서 배출량 및 기간이 감소하였음.



(마) 공격접종 2주째 부검 후 폐의 병리조직학적 검사 결과 H3N2 공격접종시 상용백신과 CIV+범용항원군이 병변이 약하게 나타났으며, H1N1 공격접종시 CIV+범용항원군에서 병변이 가장 약하게 확인되었음.



## 다. 역유전학 시스템 구축

### (1) 인플루엔자 바이러스 표준주 재조합 바이러스 특성 분석

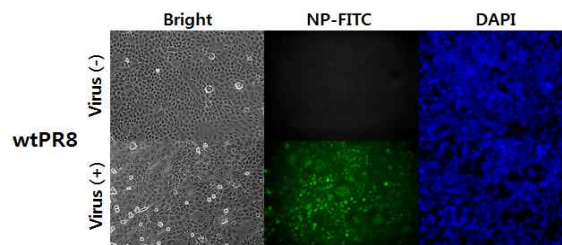
#### (가) 생물학적 특성 분석

- ① 바이러스 역가 비교 분석: 야생형 바이러스와 인위조작 재조합 바이러스의 바이러스 역가를 비교 분석한 결과, hemagglutination (HA) 역가와 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>)는 동일하였고, 50% egg infectious dose (ECID<sub>50</sub>)는 인위조작 재조합 바이러스에서 다소 높았음(표 1)

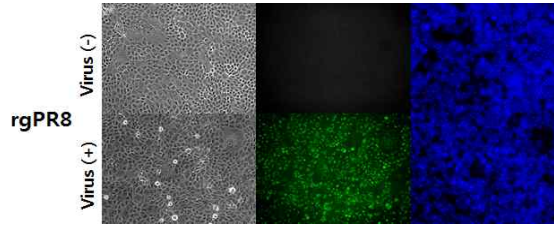
	wtPR8	=	rgPR8
HA titer	512	=	512
Log <sub>10</sub> EID <sub>50</sub> /ml	8.0	<	9.5
Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml	7.167	≈	7.134

<표 1> 야생형 PR8 바이러스와 인위조작 재조합 PR8 바이러스에 대한 역가 비교 분석

- ② 세포 감염성 비교 분석: 야생형 바이러스와 인위조작 재조합 바이러스의 MDCK 세포에 대한 감염성을 비교 분석한 결과, 두 바이러스 모두 MDCK 세포에 효과적으로 감염하는 것을 확인함 (그림 5)

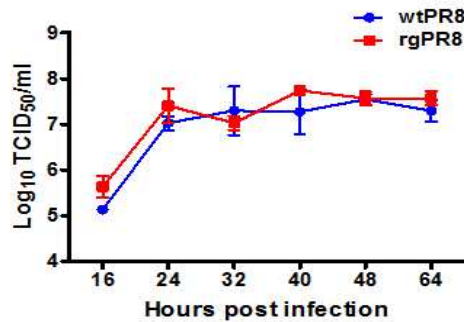






<그림 5> 야생형 PR8 바이러스와 인위조작 재조합 PR8 바이러스에 대한 MDCK 세포 감염성 비교 분석

(나) 세포 내 증식양상 비교 분석: 야생형 바이러스와 인위조작 재조합 바이러스의 증식양상을 MDCK 세포를 이용하여 비교 분석한 결과, 두 바이러스 증식양상은 거의 동일하였음 (그림 6)



<그림 6> 야생형 PR8 바이러스와 인위조작 재조합 PR8 바이러스에 대한 MDCK 세포 내 증식양상 비교 분석

(다) 유전학적 특성 분석

- ① 야생형 PR8 바이러스와 인위조작 재조합 PR8 바이러스의 유전자 염기서열을 비교 분석함
- ② 바이러스의 표면 단백질 유전자 및 내부 유전자들에 대한 염기서열을 비교 분석한 결과, 헤마뉴라미니데이즈(neuraminidase, NA) 유전자의 1개 염기서열에서 차이를 보였으나, 아미노산 염기서열 상에서는 차이가 없었으며, 나머지 모든 유전자 염기서열은 동일하였음

	HA	NA
wtPR8/rgPR8 (identity)	1968/1968 (100%)	1365/1364 (99.9%)
		1050 1060
		wt 1041 C A A A A G T C A C A G T T C C A G A C
		rg 1041 C A A A G T C A C A G T T C C A G A C

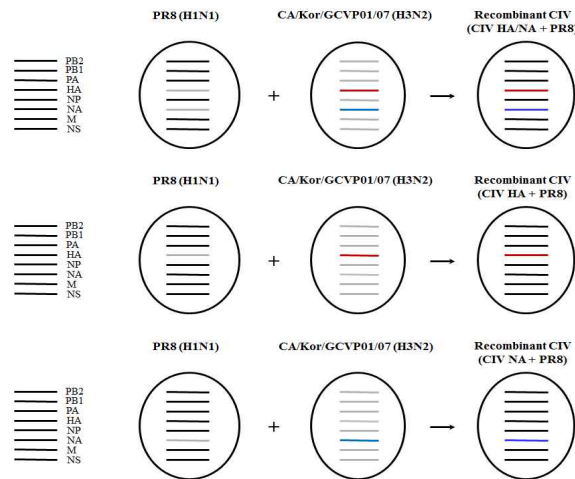
<표 2> 야생형 PR8 바이러스와 인위조작 재조합 PR8

(2) 재조합 개 인플루엔자 백신 플랫폼 확립

(가) 신규 재조합 개 인플루엔자 바이러스 백신주 합성

- ① 인플루엔자 바이러스 표준주인 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스의 내부 유전자 절편 (polymerase basic protein 2 (PB2) gene, polymerase basic protein 1 (PB1) gene, polymerase acidic protein (PA) gene, nucleocapsid protein (NP) gene, matrix (M) protein gene 및 nonstructural (NS) protein gene)에 대한 RT-PCR을 수행하여 각 유전자 절편의 cDNA를 합성하고 pHW2000 벡터에 삽입하여 클로닝함

- ② 개 인플루엔자 바이러스 백신주인 A/Canine/Korea/GCVP01/2007 (H3N2) 바이러스의 표면 항원 단백질(헤미글루티닌(hemagglutinin, HA) 및 뉴라미니다제(neuraminidase, NA))에 대한 RT-PCR을 수행하여 각 유전자 절편의 cDNA를 합성하고 pHW2000 벡터에 삽입하여 클로닝함
- ③ 상기 클로닝된 유전자 절편을 숙주세포에 혼합 형질도입하여 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스 backbone에 개 인플루엔자 바이러스의 HA 및 NA, HA 또는 NA를 가지는 신규 재조합 개 인플루엔자 바이러스를 합성함(그림 7)



<그림 7> 재조합 개 인플루엔자 바이러스 합성 모식도

(나) 신규 재조합 개 인플루엔자 바이러스 특성 분석

- ① 바이러스 역가 비교 분석: 야생형 바이러스(A/Canine/Korea/GCVP01/07, H3N2) 및 세 가지 종류의 인위조작 재조합 개 인플루엔자 바이러스(CIV HA/NA+PR8, CIV HA+PR8 및 CIV NA+PR8)에 대한 바이러스 역가를 측정함. 측정 결과, 야생형 바이러스 및 세 가지 종류의 인위조작 재조합 개 인플루엔자 바이러스 모두 HA titer 128을 나타냄 (표 3)

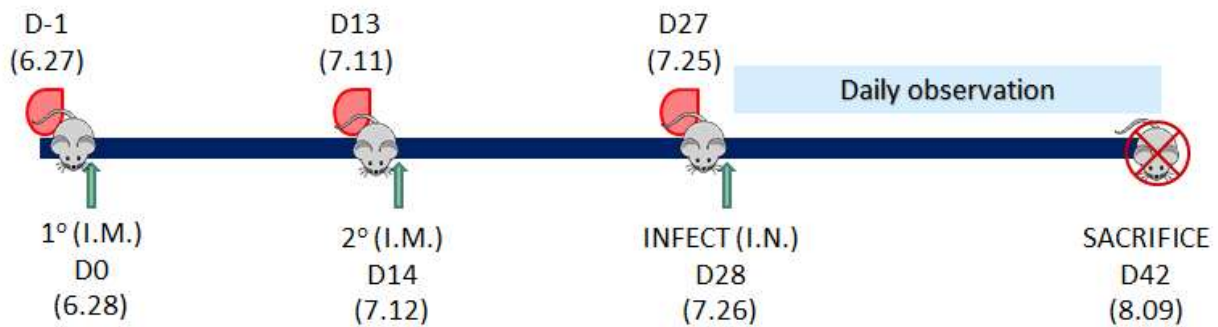
Sample	HA Titer	Virus (mL)	PBS (mL)	Total	Formaldehyde (μL)
CIV HA/NA + PR8	128	6	24	30	60
CIV HA + PR8	128	7	21	28	56
CIV NA + PR8	128	6	24	30	60
WT CIV (GCVP01)	128	7	21	20	56

<표 3> 야생형 CIV 바이러스 및 인위조작 재조합 CIV 바이러스에 대한 HA titer 및 백신 stock 제조 과정 요약

- ② 야생형 CIV 바이러스와 인위조작 재조합 CIV 바이러스의 유전자 염기서열을 비교 분석함
- ③ Backbone 유전자 절편 염기서열은 PR8 바이러스의 해당 유전자 절편 염기서열과 동일하였으며, 재조합 CIV 바이러스의 재조합 유전자 절편 염기서열은 야생형 CIV 바이러스의 해당 유전자 절편 염기서열과 동일하였음

(3) 재조합 개 인플루엔자 바이러스를 이용한 백신 개발

- ① 신규 재조합 개 인플루엔자 백신은 표 3에서 상기 기술된 세 가지 종류의 재조합 개 인플루엔자 바이러스(CIV HA/NA+PR8, CIV HA+PR8 및 CIV NA+PR8)를 기존 백신제조공정 프로토콜에 맞추어 포르말린으로 불활화하여 제조함. 양성대조군으로서 야생형 CIV 바이러스(A/Canine/GCVP01/2007, H3N2)를 포르말린으로 불활화하여 사용함
- ② 불활화된 세 가지 종류의 재조합 개 인플루엔자 바이러스 및 야생형 CIV 바이러스를 기존 백신제조공정 및 효능 검증 프로토콜에 맞추어 그룹당 10마리의 마우스에 면역 접종함(그림 8)



<그림 8> 재조합 개 인플루엔자 백신 접종 일정

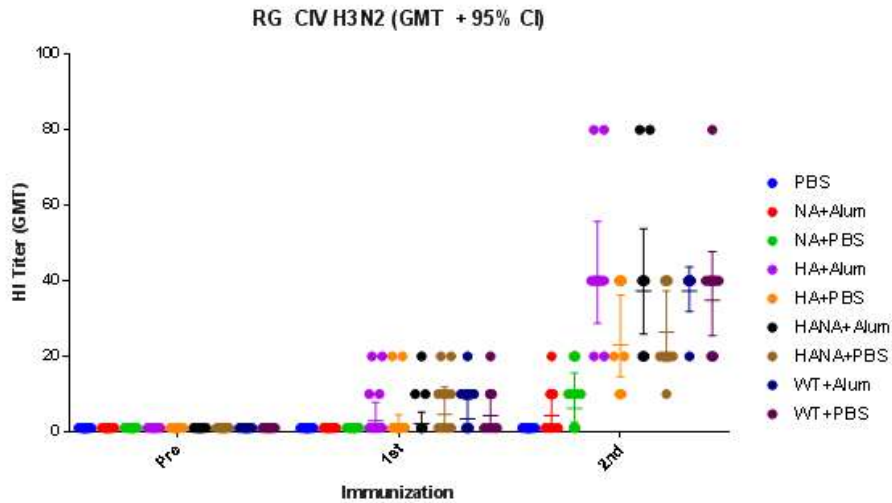
(4) 신규 재조합 개 인플루엔자 백신에 대한 면역원성 분석

(가) 재조합 개 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 면역원성 분석 프로토콜

- ① 재조합 개 인플루엔자 바이러스를 백신주로 사용하여 개발한 신규 재조합 개 인플루엔자 백신의 효능을 마우스 실험동물모델을 이용하여 비교 분석함
- ② 기존 백신제조공정 및 효능 검증 프로토콜: 각 바이러스는 HA 27(128)이 되도록 PBS로 희석을 하였으며, 0.2% 포르말린으로 상온에서 8시간 또는 4도에서 overnight 불활화시킴. 불활화된 각 바이러스를 마우스 당 100 µl의 농도로 근육 접종함. 면역 접종은 2주 간격으로 총 2회 실시함. 아췌번트로서 20% alum을 사용함. 2차 면역 접종한 다음 2주 후에 마우스로부터 혈청을 분리하여 hemagglutination inhibition (HI) 항체가를 측정함

(나) 재조합 개 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 면역원성 분석 결과

- ① 재조합 개 인플루엔자 백신 면역 접종 시점별로 마우스로부터 혈청을 분리하여 HI 항체가를 측정함
- ② HI 항체가 측정 결과, 20% alum을 아췌번트로 사용 시, CIV 바이러스의 HA 또는 HA+NA가 PR8 backbone에 재조합된 바이러스 백신주의 경우, 기존 개 인플루엔자 백신 형태의 야생형 CIV 바이러스 불활화 백신과 유사하거나 보다 높은 HI 항체가를 유도하는 것을 확인함(그림 9)



<그림 9> 재조합 개 인플루엔자 백신 접종에 따른 HI 항체가 비교

- ③ 상세히 기술하면, 야생형 CIV 바이러스 불활화 백신은 2차 면역 접종 후에 20% alum 사용 시 37.3 HI GMT 값을 나타내었으며, PR8 backbone에 CIV HA를 재조합한 백신의 경우에는 20% alum 사용 시 37 HI GMT를 나타내었고, PR8 backbone에 CIV HA 및 NA를 재조합한 백신의 경우에는 20% alum 사용 시 40 HI GMT 값을 나타냄 (표 4)
- ④ 반면, 음성대조군인 PBS로 면역 접종한 경우에는 HI 항체가가 모든 마우스에서 검출 한계 미만이었으며, PR8 backbone에 CIV NA를 재조합한 백신의 경우에는 면역원성이 상대적으로 현저히 낮은 것을 확인할 수 있음
- ⑤ 따라서, PR8 backbone에 CIV의 HA 또는 HA 및 NA를 재조합하여 백신을 제조할 경우 기존의 개 인플루엔자 불활화 백신을 대체 가능할 것으로 판단함

Group	HI GMT		
	Chicken RBC		
	CIV H3N2 (GCVP01)		
	Pre-immunization	1 <sup>st</sup> immunization	2 <sup>nd</sup> immunization
PBS	<10 (0/10)	<10 (0/10)	<10 (0/10)
CIV NA + PR8 (w/ alum)	<10 (0/10)	<10 (0/10)	11.2 (6/10)
CIV NA + PR8 (w/o alum)	<10 (0/10)	<10 (0/10)	13.5 (7/10)
CIV HA + PR8 (w/ alum)	<10 (0/10)	14.1 (4/10)	40 (10/10)
CIV HA + PR8 (w/o alum)	<10 (0/10)	20 (2/10)	23 (10/10)
CIV HA/NA + PR8 (w/ alum)	<10 (0/10)	13 (4/10)	37 (10/10)
CIV HA/NA + PR8 (w/o alum)	<10 (0/10)	13 (6/10)	26 (10/10)
WT CIV (w/ alum)	<10 (0/10)	11.5 (5/10)	37.3 (10/10)
WT CIV (w/o alum)	<10 (0/10)	11.2 (6/10)	34.8 (10/10)

<표 4> 재조합 개 인플루엔자 백신 접종에 따른 HI 항체가 비교

(5) 신규 재조합 개 인플루엔자 백신에 대한 안정성 분석

(가) 재조합 개 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 안정성 분석 결과

- ① 재조합 개 인플루엔자 바이러스를 백신주로 사용하여 개발한 신규 재조합 개 인플루엔자 백신의 안정성을 마우스 실험동물모델을 이용하여 비교 분석함
- ② 재조합 개 인플루엔자 백신을 섭씨 4도에서 6개월 동안 보관하였으며, 보관 전 (pre-incubation), 보관 3개월 후(3 mos post-incubation) 및 보관 6개월 후(6 mos post-incubation)로 세분하여 백신의 면역원성(HI 항체가)을 측정 후 비교 분석함
- ③ 보관 전, 보관 3개월 후 및 보관 6개월 후의 재조합 개 인플루엔자 백신을 마우스에 2회 면역접종한 후 혈청을 분리함. 혈청 내의 HI 항체에 대한 항체 역가를 닭의 적혈구를 이용해 측정함
- ④ <표 5>에서 보이는 바와 같이, PR8 backbone에 CIV HA(CIV HA+PR8) 또는 HA 및 NA(CIV HA/NA+PR8)를 재조합한 백신 모두에서 HI 항체가가 3개월 및 6개월 후에도 유지되는 것을 확인할 수 있었음
- ⑤ 이와 같은 재조합 개 인플루엔자 백신의 보관기간에 따른 안정성 결과는 alum 아쥘변트 사용 유무에 관계없이 안정성이 유지되는 것을 확인할 수 있었음

Group	HI GMT		
	Chicken RBC		
	Pre-incubation	3 mos post-incubation	6 mos post-incubation
PBS	<10 (0/10)	<10 (0/10)	<10 (0/10)
NA (alum)	<10 (0/10)	13.46 (7/10)	10 (7/10)
NA (PBS)	<10 (0/10)	11.89 (4/10)	10 (9/10)
HA (alum)	64.98 (10/10)	46.66 (9/10)	45.95 (10/10)
HA (PBS)	28.28 (10/10)	37.32 (10/10)	45.95 (10/10)
HANA (alum)	56.57 (10/10)	34.82 (10/10)	52.78 (10/10)
HANA (PBS)	40 (10/10)	37.32 (10/10)	69.64 (10/10)
WT (alum)	40 (10/10)	37.32 (10/10)	85.74 (10/10)
WT (PBS)	42.84 (10/10)	40 (10/10)	49.24 (10/10)
CaniFlu			37.32 (10/10)

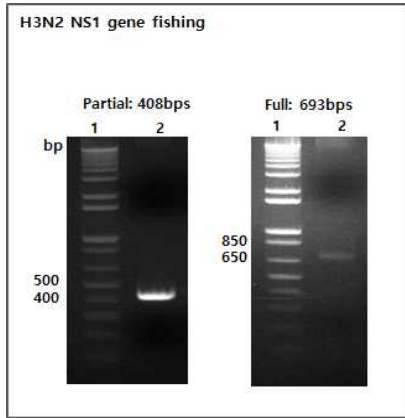
<표 5> 재조합 개 인플루엔자 백신 안정성 분석 결과

**라. 개 인플루엔자 감별 진단법 개발을 위한 raw material 개발**

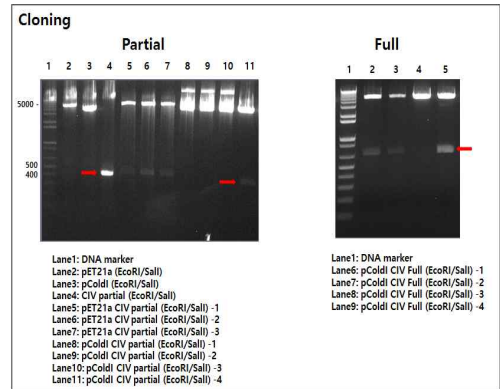
(1) E.coli & baculovirus 발현시스템을 이용 재조합단백질 개발 및 항원성 평가

(가) canine influenza H3N2 rec. NS1 제작

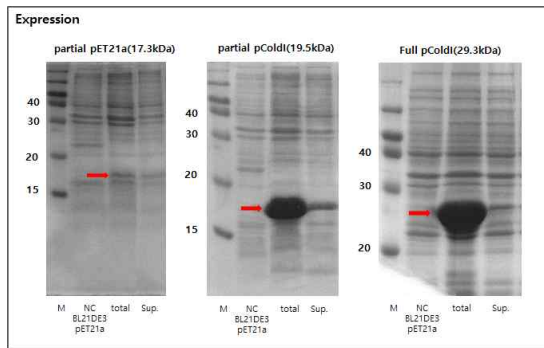
- ① H3N2 NS1 gene (full & partial) fishing



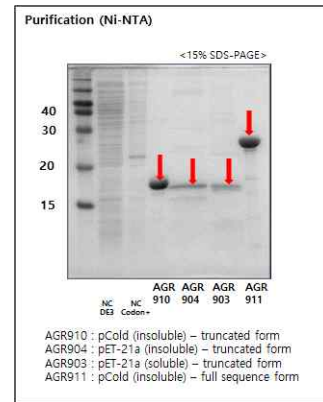
- H3N2 NS1 gene (full & partial) fishing



- H3N2 NS1 gene cloning(full & partial)

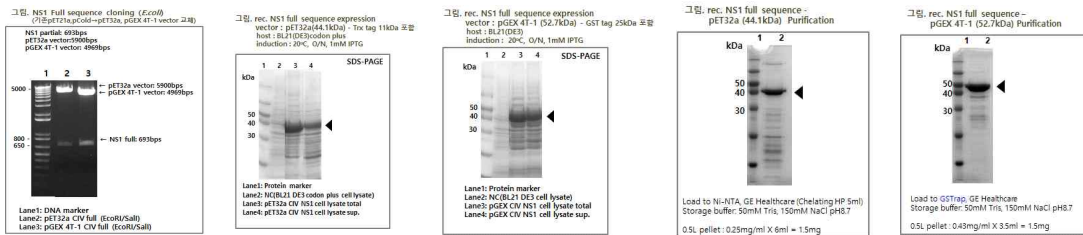


- H3N2 NS1 expression(full & partial)



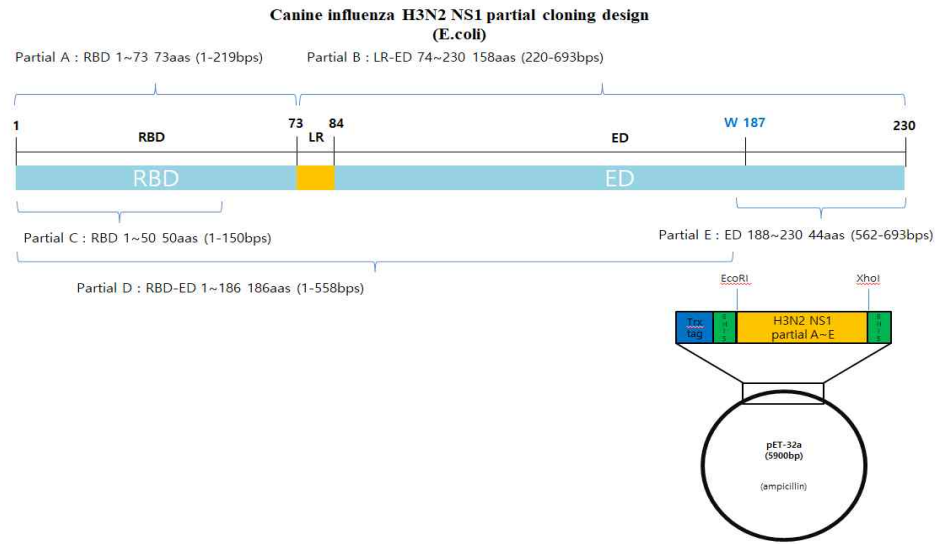
- H3N2 NS1 purification (full & partial)

② rec. NS1 tag 변환 form (E.coli expression system) 제작

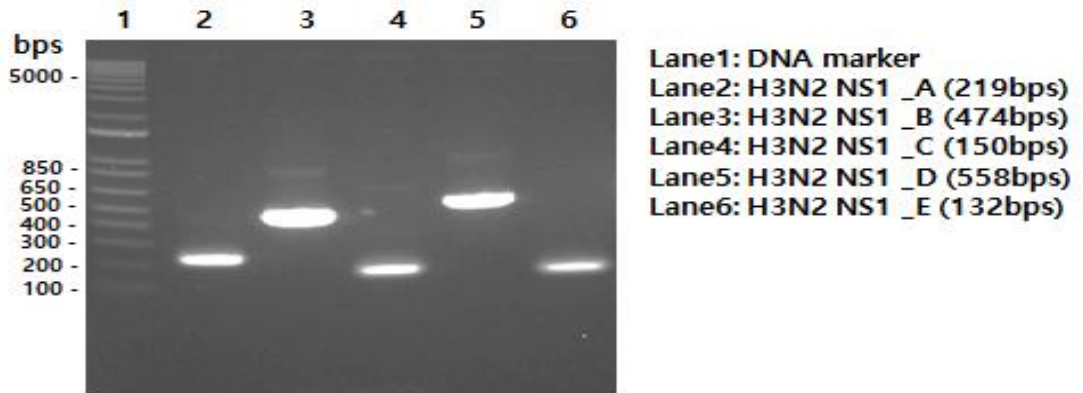


③ NS1 truncated form (E.coli expression system) 제작

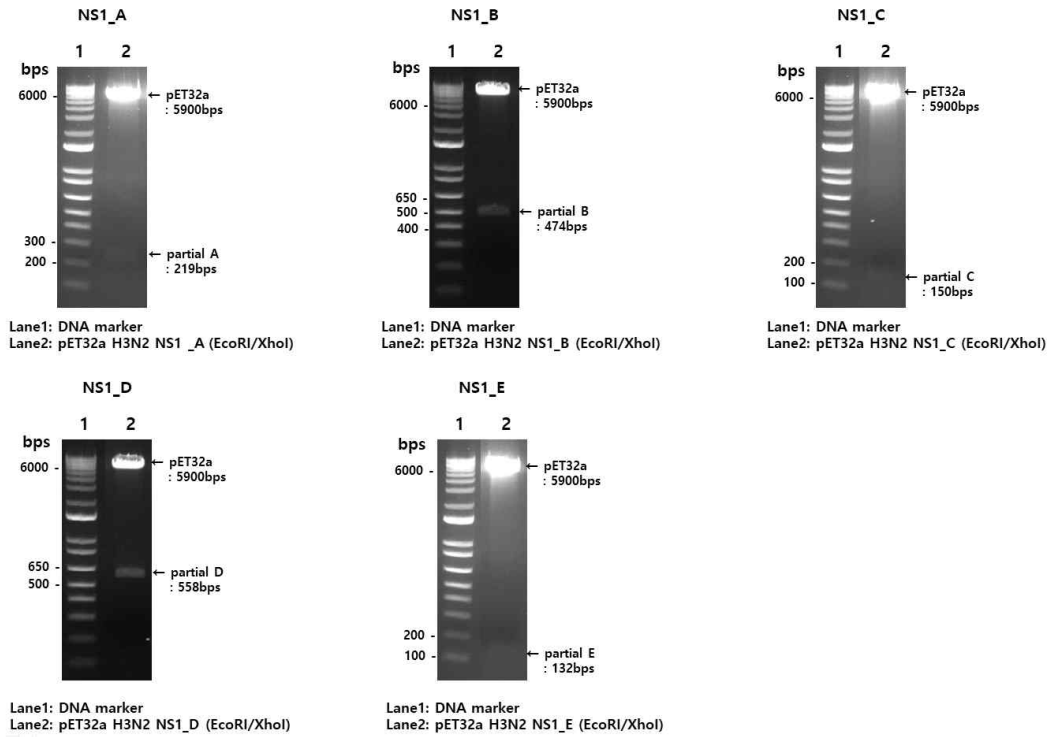
㉞ rec, NS1 Truncated form 개발전략



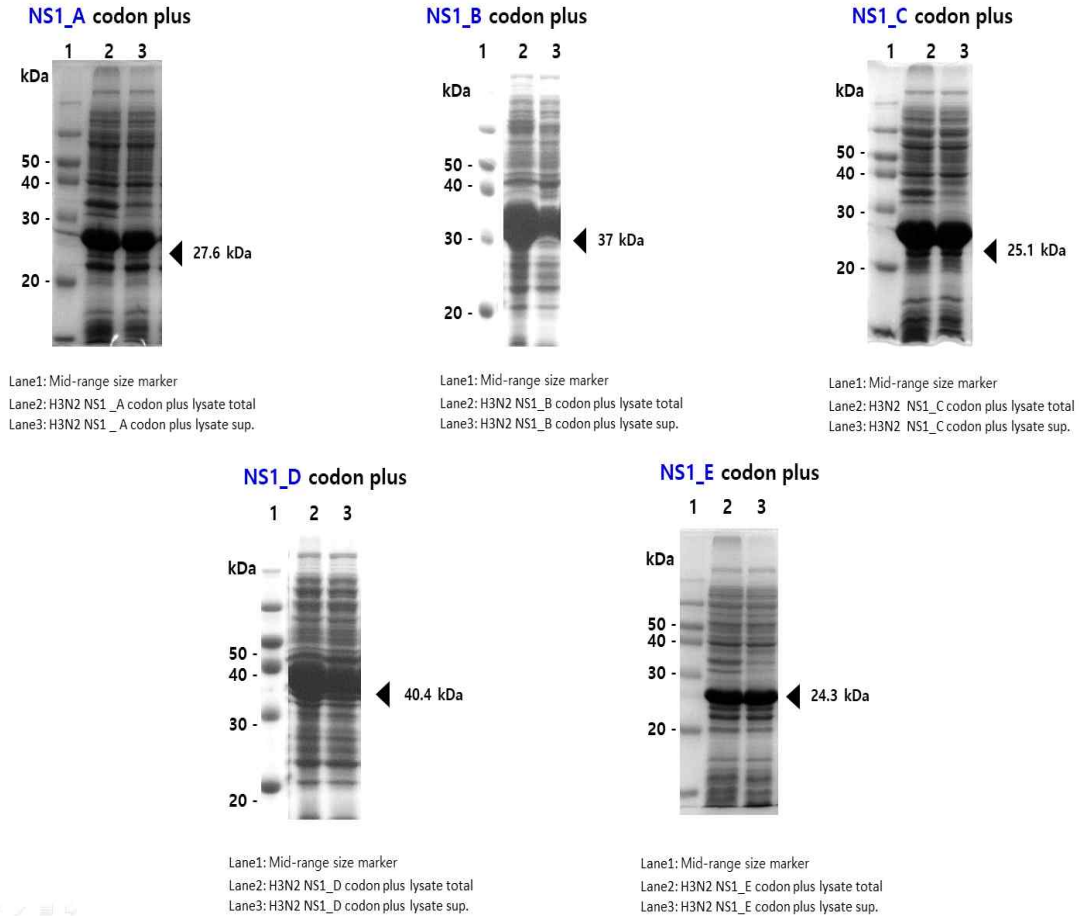
㉞ rec, NS1 Truncated form gene fishing



Ⓢ rec, NS1 Truncated form gene cloning



Ⓢ rec, NS1 Truncated form expression





④ Baculovirus expression system 을 이용한 rec. NS1 제작

그림. rec. NS1 partial sequence cloning (Baculovirus expression)

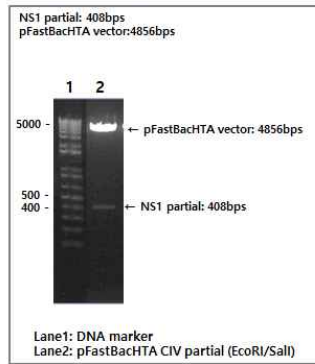


그림. Rec. NS1 partial sequence expression (19.8kDa) host : Sf9 cell, MOI1, 5day

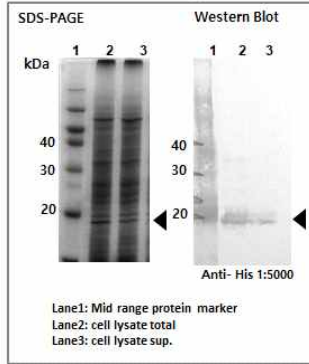
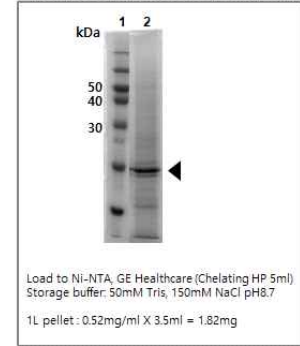


그림. Rec. NS1 partial sequence purification (19.8kDa)



⑤ recombinant nucleoprotein expression & western blot

그림. rec. NS1 Full sequence purification (29.8kDa)

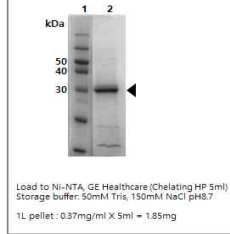


그림. H3N2 rec. nucleoprotein from baculovirus expression system) expression & western blot analysis by specific mAb

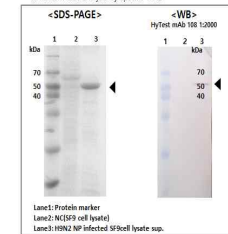


그림. rec. NS1 full sequence cloning (Baculovirus expression)

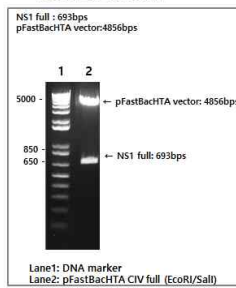
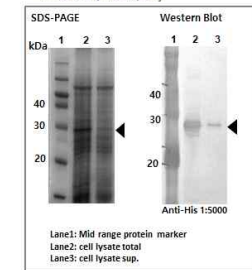


그림. rec. NS1 Full sequence expression (29.8kDa) host : Sf9 cell, MOI 0.1, 7day



⑥ 재조합 NS1 감지용 단클론 항체 제작(9종) 및 반응성 확인

표. Canine influenza H3N2 recombinant NS1으로 면역한 mouse 항혈청의 antibody titer

	Coated Ag rec. NS1 (E.coli) (1ug/ml)	ELISA O.D (450nm)
Serum dilution rate	1/100	2.70
	1/200	2.65
	1/400	2.75
	1/800	2.74
	1/1,600	2.66
	1/3,200	2.51
	1/6,400	2.44
	1/12,800	2.53



표. Canine influenza H3N2 Recombinant NS1을 mouse 면역화 후 제작된 단클론항체 9종

No.	Screening Result			Isotype
	Clone name	O.D (450nm)	IFA	
1	8D2	2.12	+	G1
2	8D10	1.76	+	M, G1
3	8D73	1.82	+	G1
4	8D87	2.37	+	G1
5	8D94	2.08	+	G1
6	7G25	0.53	+	G1, G3
7	7G23	1.72	+	A
8	7896	2.22	+	G1
9	7894	2.26	+	G1

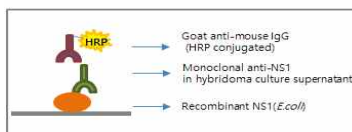
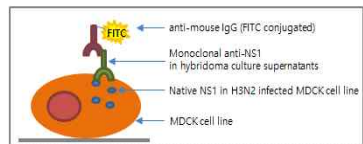


그림. 제작된 단클론항체의 Native NS1에 대한 반응성 (IFA)



마. 개 인플루엔자 감별진단을 위한 진단키트 개발

- (1) NS1 및 nucleoprotein 재조합단백질을 이용한 assay format 별 ELISA 반응성 확인
- (가) H3N2 공격접종 개 항혈청을 이용한 rec. NS1 항원성 평가 (indirect ELISA)

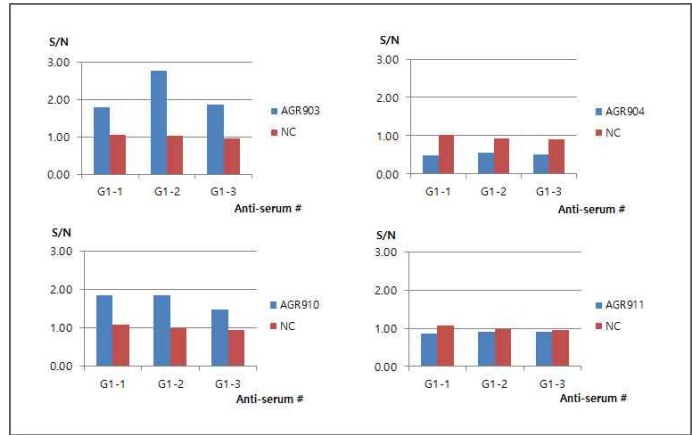


그림. E.coli 재조합 NS1 candidates 반응성  
 AGR903 : pET-21a (soluble) – truncated form  
 AGR904 : pET-21a (insoluble) – truncated form  
 AGR910 : pCold (insoluble) – truncated form  
 AGR911 : pCold (insoluble) – full sequence form

(나) H3N2 rec. NS1 candidates(E.coli & Baculovirus expression & tag(HIS & GST & TRX) 변환)의 coating 농도별 반응성 비교 (H3N2 공격접종 개 항혈청 및 음성혈청을 이용한 indirect ELISA)

그림. H3N2 recombinant NS1 (*E.coli*) candidate의 coating 농도 별 반응성 비교  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)

\* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum

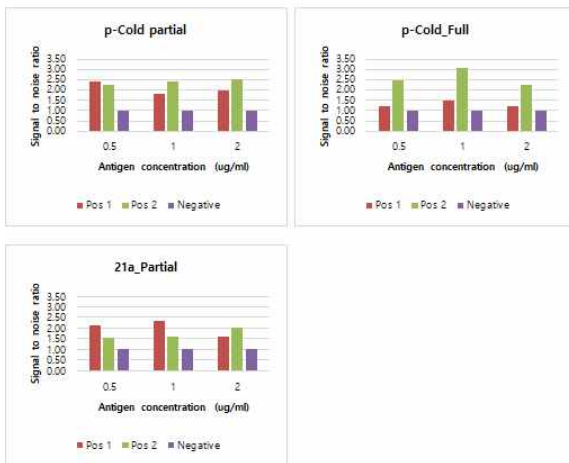


그림. H3N2 recombinant NS1 (*E.coli*) candidate의 coating 농도 별 반응성 비교 II  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)

\* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum

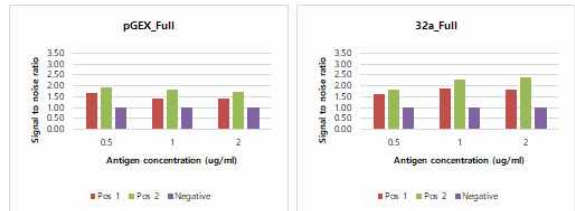
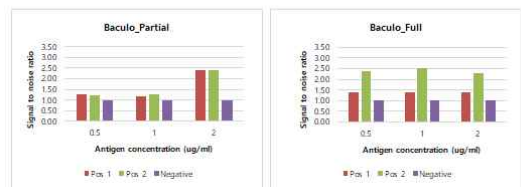


그림. H3N2 recombinant NS1 (Baculovirus) candidate의 coating 농도 별 반응성 비교 III  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)

\* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum



(다) H3N2 rec. NS1 candidates(E.coli & Baculovirus expression & tag(HIS & GST & TRX) 변환)의 검체희석배수에 따른 반응성 비교 (H3N2 공격접종 개 항혈청 및 음성혈청을 이용한 indirect ELISA)

그림. H3N2 recombinant NS1 (*E.coli*) candidate의 검체희석 별 반응성 비교 I  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)  
 \* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum

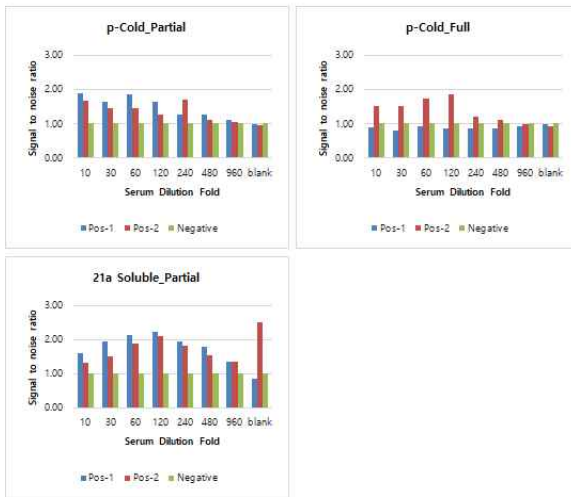


그림. H3N2 recombinant NS1 (*E.coli*) candidate의 검체희석 별 반응성 비교 II  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)  
 \* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum

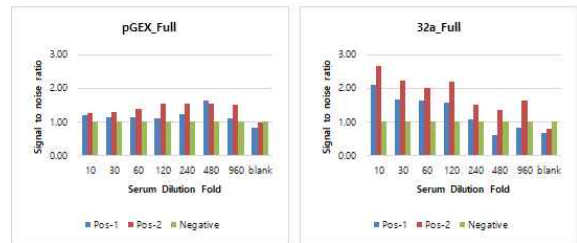
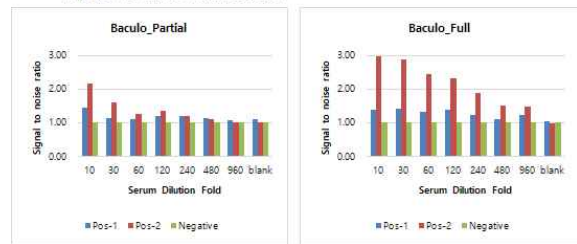
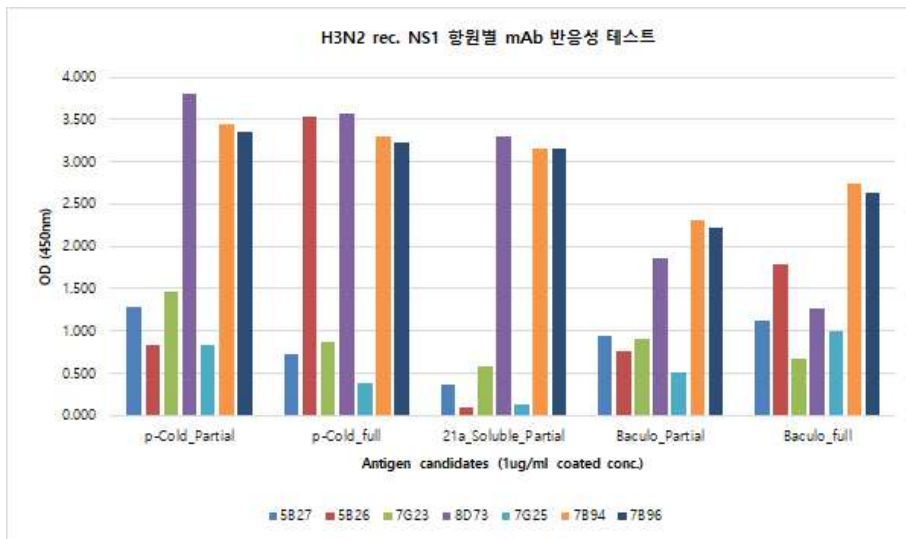


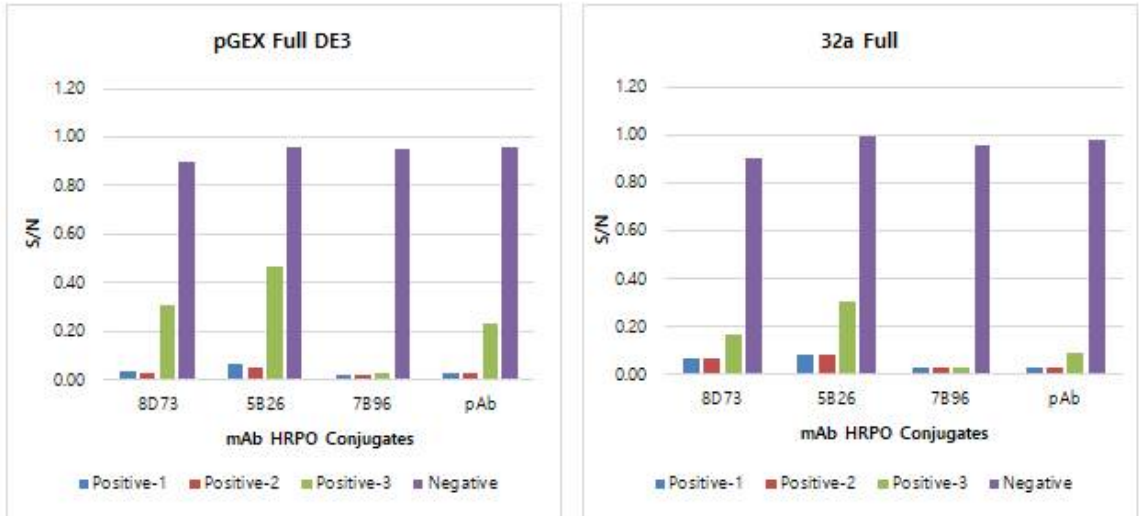
그림. H3N2 recombinant NS1 (Baculovirus) candidate의 검체희석 별 반응성 비교 III  
 indirect ELISA (capture : rec. NS1 candidate, conjugate : anti-swine IgG HRP conjugated)  
 \* Pos 1 : H3N2 infected serum #1, Pos 2 : H3N2 infected serum #2  
 Negative : non-infected normal dog serum



(라) H3N2 rec. NS1 candidates(*E.coli* & Baculovirus expression & tag(HIS & GST & TRX) 변환)에 대한 단클론항체(monoclonal anti-NS1) 별 반응성 비교 (H3N2 rec. NS1 candidate coated plate와 단클론항체 7종을 반응시킨 후 goat anti-mouse IgG HRP conjugate를 이용하여 반응성 분석 - indirect ELISA)

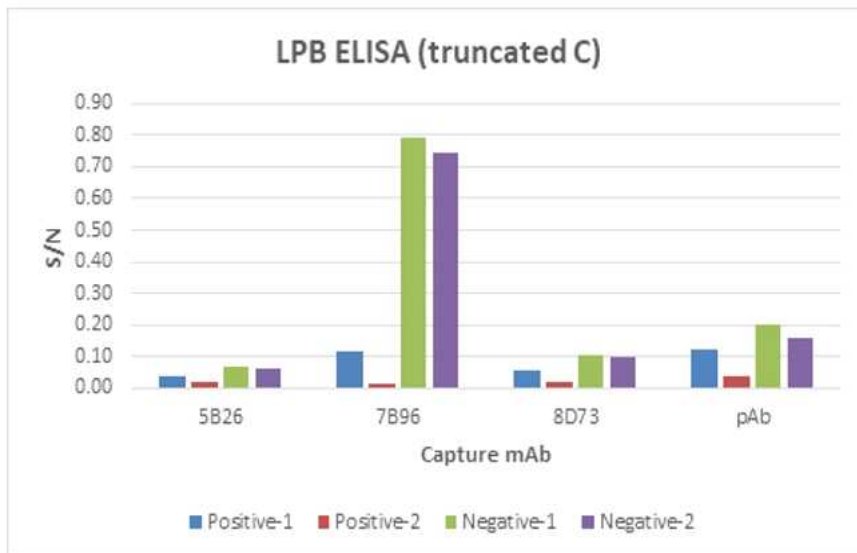


(마) H3N2 recombinant NS1 (*E.coli* tag 변환) candidate와 monoclonal anti-NS1-HRP conjugates의 반응 시 canine influenza H3N2 공격집중 항혈청(canine anti-NS1 antibody포함)에 의한 반응 저해효과 (competition) 비교 (blocking Ab ELISA 가능성 확인)



(바) H3N2 recombinant NS1 truncated form(E.coli) candidate와 monoclonal anti-NS1-HRP conjugates의 반응 시 canine influenza H3N2 공격접종 항혈청(canine anti-NS1 antibody포함)에 의한 반응 저해효과 (competition) 비교 (Liquid phase blocking(LPB) Ab ELISA 가능성확인)

- ① H3N2 rec, NS1 truncated form candidate (A~E)와 monoclonal anti-NS1 3종과 poly anti-NS1 candidate 1종을 조합하여 LPB ELISA로 평가한 결과 rec, NS1 truncated C와 monoclonal anti-NS1 antibody 7B96 capture Ab)의 조합이 가장 좋은 결과를 보임
- ② H3N2 rec, NS1 truncated C와 monoclonal anti-NS1 antibody 7B96 (capture Ab), anti-NS1-HRP conjugate (7B96)의 조합이 반응성이 좋음

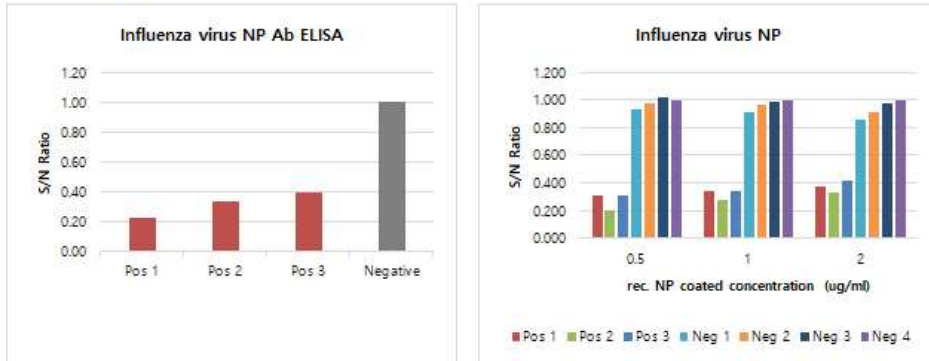


(사) rec. NP(nucleoprotein) 및 monoclonal anti-NP HRP conjugate 을 이용한 blocking Ab ELISA 의 반응성 비교

- ① 음성혈청대비 양성혈청에서 반응저해효과 확인

그림. Recombinant NP(nucleoprotein) 및 monoclonal anti-NP HRP conjugate 을 이용한 blocking Ab ELISA 의 반응성 비교

\* S/N ratio : signal to noise ratio  
 \* Pos 1 : canine influenza H3N2 infected serum #1  
 Pos 2 : canine influenza H3N2 infected serum #2  
 Pos 3 : canine influenza H3N2 infected serum #3  
 Negative : non-infected normal canine serum



(아) H3N2 rec. NS1 capture 및 protein A gold conjugate 을 이용한 indirect Ab detection 용 immunochromatographic assay 반응성 확인

① 음성혈청대비 양성혈청에서 높은 반응성 확인

그림. H3N2 recombinant NS1 및 protein A gold conjugate를 이용한 indirect immunochromatographic assay 반응성

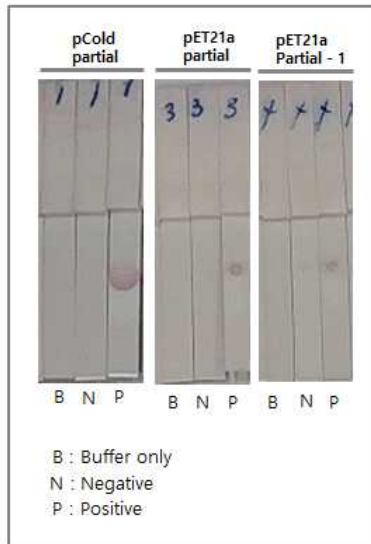
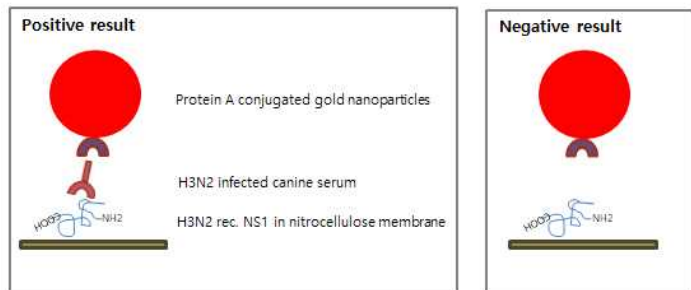


그림. Indirect immunochromatographic assay 반응원리



Rec. NS1 candidates dotting conc. : 0.5mg/ml  
 Canine serum dilution rate : 1/30  
 Reaction time : 15min.

② 다른 양/음성 검체를 추가로 확인하였으나 재현성이 좋지 않고 양/음성 구분이 잘 되지 않아 다른 format을 적용하였다.

(자) H3N2 recombinant NS1 candidate 및 NS1 specific mAb을 이용한 blocking assay

① 양성혈청에서 blocking되어 음성혈청 대비 line이 약하게 나오는 것을 확인하였다.

그림. H3N2 recombinant NS1 candidate 및 NS1 specific mAb를 이용한 blocking assay 반응상

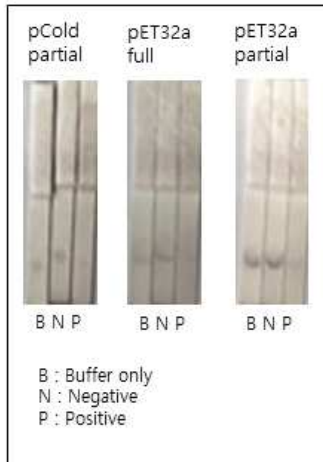
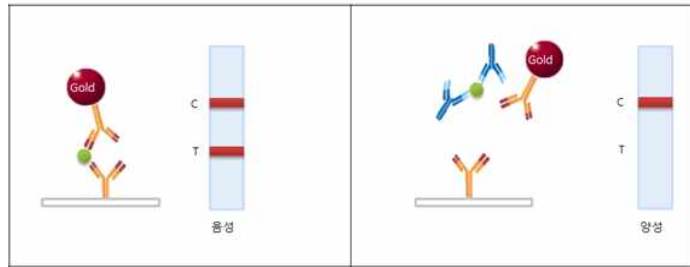


그림. blocking assay 반응원리



 CIV mAb      실제 검체 내 CIV Ab      CIV 재조합 항원  
 Anti-NS1 dotting conc. : 2mg/ml  
 Rec. NS1 candidate conc. : 3ug/ml  
 Canine serum dilution rate : 50:50  
 Reaction time : 10min

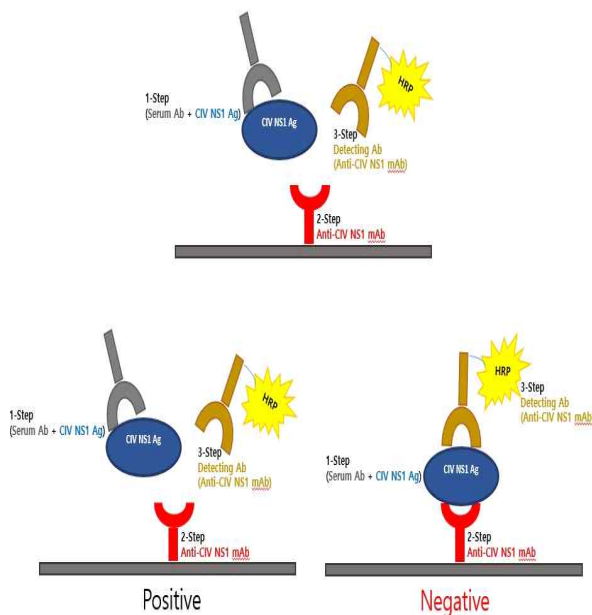
② blocking assay는 육안판별이 어려워서 Gold reader (Medisensor社)를 이용하여 Test line의 density를 수치화 하였다.

## 바. 개 인플루엔자 백신항체 및 감염항체 감별용 (DIVA) 진단키트 인허가 서류 접수

(1) 재조합 NS1 및 단클론항체를 이용한 진단키트 제품화 및 성능평가 및 인허가 서류 작성  
(가) 인플루엔자 감염 항체 진단용 키트 (CIV NS1 Ab ELISA)

① 제품 설명

㉞ liquid phase blocking (LPB) 방식의 ELISA kit로 개 인플루엔자 바이러스 NS1 truncated C 재조합 항원 (*E.coli*)과 검체를 반응시키면 검체 내에 항체가 있는 경우 상기 재조합 항원이 검체 내 항체와 반응하여 capture ab (7B96)와 detector Ab (7B96)와의 반응성이 나타나지 않는 형태이다.



<LPB ELISA kit assay 반응원리>

## ② 제품 사진



번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	CIV NS1 항체 흡착 플레이트 (CIV NS1 Ab Coated Plate)	5장	방습제를 포함하고 피우차 포장으로 이루어진 96-well plate
2	10X 세척액 (10X Washing Buffer)	1개	무색 투명한 액체
3	희석 희석액 (Sample Dilution Buffer)	1개	적색 투명한 액체
4	CIV NS1 항원 (CIV NS1 Antigen)	1개	lyophilized
5	항원 희석액 (Reconstitution Diluent)	1개	무색 투명한 액체
6	HRPO Anti-CIV NS1 Conjugate	1개	청색액의 액체
7	양성대조 (Positive Control)	1개	적색의 액체
8	음성대조 (Negative Control)	1개	청색의 액체
9	발색제 (TMB Substrate)	1개	무색 투명한 액체
10	중지액 (Stop Solution)	1개	무색 투명한 액체

## ③ 제품설명서

### VDPro® 개 인플루엔자 바이러스 NS1 항체 ELISA (VDPro® CIV NS1 Ab ELISA) Cat. No. EC-CIV-02



#### 1. 제품의 개요 및 원리

VDPro® CIV NS1 Ab ELISA 제품은 재조합 개 인플루엔자 바이러스 (CIV) 항원을 기반으로 한 liquid phase blocking ELISA (LPB ELISA)를 이용한 재의 진단용 제품으로 CIV 감염에 의해 생성되는 개 항체 검사에 적용 할 수 있습니다. CIV non-structural protein 1 (NS1) 항원과 **검체**, 항체를 먼저 반응시킨 후, NS1 항원에 특이적인 Anti-CIV NS1 항체가 고정화된 플레이트에 **검체**, 항원과 NS1 항원 혼합 **반응액**을 첨가합니다. 그 후 효소가 결합된 HRPO Anti-CIV NS1 Conjugate를 반응시키고 연속하여 발색제를 첨가합니다. 반응 내에 특이 항체가 존재하면 CIV NS1 항원에 특이적인 HRPO Anti-CIV NS1 Conjugate에 대한 반응이 차단되어 발색이 감소하며, 항체가 존재하지 않으면 항원에 대한 차단이 일어나지 않아 높은 발색반응이 나타나게 됩니다. 반응 결과는 음성대조에 대한 **검정** 항체의 **용량비**(S/N, Sample to Negative control ratio)를 사용하여 판정합니다.

#### 2. 제품의 구성

Reagents	192tests	480tests
1) CIV NS1 항체 흡착 플레이트 (Anti-CIV NS1 Ab Coated Plate)	2 plates	5 plates
2) 10X 세척액 (10X Washing Buffer)	120mL X1	240mL X1
3) 검체 희석액 (Sample Dilution Buffer)	60mL X1	60mL X1
4) CIV NS1 항원 (CIV NS1 Antigen; Lyophilized)	30mL X1	30mL X1
5) 항원 희석액 (Reconstitution Diluent)	30mL X1	30mL X1
6) 양성대조 (Positive Control)	3.0mL X1	7.0mL X 1
7) 음성대조 (Negative Control)	3.0mL X1	7.0mL X 1
8) HRPO Anti-CIV NS1 Conjugate	40mL X1	70mL X 1
9) 발색제 (TMB Substrate)	30mL X1	70mL X 1
10) 중지액 (Stop Solution)	20mL X1	40mL X 1
11) 사용설명서	1부	1부

#### 3. 검사 필요량 및 소모품

- 1) 마이크로 피펫 및 팁(tip)
- 2) 항원 희석액 플레이트
- 3) B 또는 12 채널 마이크로 피펫
- 4) 증류수
- 5) 판독기: ELISA reader (450nm)
- 6) ELISA plate용 자동 또는 **반자동** 세척기

#### 4. 시약 및 시료의 준비

- 1) 1X 세척액 (1X Washing Buffer)  
- 20mL의 10X Washing Buffer를 180mL의 증류수와 잘 혼합하여 사용합니다.
- 2) Substrate 준비  
- 발색제 (TMB Substrate)는 사용 전에 꺼내 실온 온도와 비슷하게 유지시킨 후 사용합니다.  
- Plate 1장당 약 10 mL 이 소요됩니다.
- 3) CIV NS1 항원 준비  
- 동결 건조된 CIV NS1 항원 (CIV NS1 Antigen)은 항원 희석액 (Reconstitution Diluent) 30mL로 녹여서 사용합니다. 녹인 후에는 aliquot하여 -50~90°C에 얼려서 보관합니다.
- 4) 시료는 검사 전까지 -20°C 이하 냉동고에서 시료를 보관하며, **발색이 오열되거나 과도한 지방산분으로 침도가 높고 미용질이 존재하는 경우 혹은 심하게 응결된 시료는 정확성이 떨어지기 때문에 사용하지 않습니다.**

#### 5. 사용자 유의사항

##### 사용자 유의사항

- 1) 유효기간이 지난 시약은 사용하지 않습니다.
- 2) 제조번호가 다른 제품의 시약은 섞거나 함께 사용하지 않습니다.
- 3) 검사에 사용되는 용액, 가용물 등이 오염되지 않도록 주의합니다.
- 4) 생물리 재현, 보관, 이동 중에 상호 혼합되지 않도록 주의 하며 각 생물리마다 **피펫**을 교체하여 사용합니다.
- 5) ELISA 플레이트는 가끔씩 1 웰레이트 단위 (92우물)로 사용하며, 포장 내의 재순제의 색이 변형되어 분출액은 희거나 지리백의 지리가 열려있는 경우 검사에 사용하지 않습니다.
- 6) Strip Plate(96-well X 12) 제품의 남은 strip은 **처리**하여 다시 넣어 보관하지 않습니다.
- 7) 시약의 사용 시 피규와 정맥에 닿지 않도록 합니다. 사용한 모든 진단제품 재용들은 배기를 처리하여 폐기하도록 합니다.
- 8) 시약이 피부와 정맥에 닿았을 시 배는의 물로 충분히 씻어내십시오. 계속 불쾌감이 느껴지면 의사의 진찰을 받으도록 하며 물질안전보건자료를 담당 의사에게 보이도록 합니다.
- 9) 세척과정은 실험 할 때는 모든 well이 세척액으로 완전히 채워지고 **완전히** 제거되는지 확인 하고, 플레이트의 **세척액**을 버릴 때 strip이 빠지지 않도록 주의합니다.
- 10) 개봉한 플레이트는 1주일 이내에 재순제가 포함된 **처리**하여 봉인 공기를 차단하고 개봉 후 1주일 이내에 사용합니다.
- 11) 검사에 사용되는 모든 시약은 사용 전에 25±3°C 으로 맞추어 사용 합니다.
- 12) 각 반응 용액마다 다른 리저브(reservoir)를 사용하고, **리저브**는 재사용하여 사용하지 않습니다.
- 13) 본 제품의 검사결과와는 다른 임상결과나 실험결과와 함께 전문수의사가 종합적으로 판단하여 최종 진단을 내려야 합니다.
- 14) 본 제품은 **질병** 진단에 사용되는 **제외** 진단시약으로 병상감정기관 등에서만 사용되어야 한다. (육안용기 사용 제외).

**6. 검사 순서**

- 1) 모든 구성품 (항원 재포)을 실온에 적응시키고, 항원은 녹여서 얼음에서 유지시킵니다.
- 2) 할당 희석용 플레이트(별도 제공)의 각 well에 검체 희석액을 분주한 후 시료 및 양/음성대조를 총 양의 1/2은 넣고 잘 섞어줍니다. 그 후 동일한 양을 첨가해준 후 잘 섞어줍니다. (예: 검체 희석액 60µl + 시료 µl or 양/음성대조 15µl + 완충 75µl).
- 3) 37°C에서 1시간 반응시킵니다.
- 4) Anti-CIV NS1 항체 중합 플레이트의 각 well에 희석된 시료 및 양/음성대조를 각각 100µl씩 분주합니다.
- 5) 37°C에서 1시간 반응시킵니다.
- 6) 반응액을 털어버리고 1X 세척액(1X Washing Buffer) 300µl씩을 모든 well에 분주한 후, 약 20초 동안 털어버리는 과정을 3회 반복합니다.
- 7) 마지막 세척액을 제거하고 well 내에 물기가 남지 않도록 플레이트를 가위로 들고 paper towel 위에 머리 반까지 물기를 제거합니다. 이때 물기를 털어 버린 후 well이 다르지 않도록 주의하여야 합니다.
- 8) HRPO Anti-CIV NS1 Conjugate를 100µl씩 분주하고 37°C에서 1시간 반응시킵니다.
- 9) 위의 4)~5)번과 동일한 방법으로 세척합니다.
- 10) 발색제 (TMB Substrate)를 각 well에 100µl씩 분주하고 실온(22~28°C)에서 10분간 반응시킵니다.
- 11) 10분 후 반응 정지액 (Stop Solution)을 50µl씩 첨가하여 반응을 중지시킵니다.
- 12) 판독기 (ELISA Reader)의 450nm에서 흡광도(A<sub>450</sub>)를 측정합니다.
- 13) 육안으로 보아 양성대조의 발색반응이 10분 후에도 잘 안 될 경우 발색 반응시간은 20분까지 연장할 수 있습니다.
- 14) 정확한 측정을 위해서는 플레이트 well 내 거품 등 방해물을 제거한 후 판독 하는 것을 권장합니다.

**QUICK PROTOCOL**



**7. 결과 판독**

- 1) 유효성 평가 (Validation)
  - ◆ 양성대조 (Positive Control)
    - 평균 OD 같은 1.0 이하
  - ◆ 음성대조 (Negative Control)
    - 평균 OD 같은 1.5 이상

2) 결과판정 (Interpretation)  
 가검체본의 S/N ratio를 산출하여 판정합니다.

$$S/N = \frac{\text{가검체본 평균흡광도}}{\text{음성대조 평균흡광도}}$$

S/N Value	≤ 0.6	> 0.6
결과판정	양성	음성

**기술지원 및 문의**  
 유효기간 내 제품은 고객서비스기부에 의하여 제품교환  
 이나 기술지원을 요청하실 수 있습니다.  
 문의처: (주) 메디안 디노스텍 품질관리부  
 200-883 광주도 순천시 동내면 순천대로 878  
 전화 033-244-0100, 팩스 033-244-4634  
[median@mediands.com](mailto:median@mediands.com)

VDP® CIV NS1 Ab ELISA  
 Instruction Manual

- ④ 최저검출한계 (Limit of detection, LOD) 평가
- ㉠ 양성 표준검체는 H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체 (G2-5)를 음성 혈청으로 2진 희석한 후 진단키트의 최저검출한계를 확인하였으며, HI (Hemagglutination inhibition) Test 및 상용화 ELISA (IDEXX사)와 비교하였다.

Sample	샘플 희석배수	시료명	HI Titer	상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NS1 Ab ELISA		
				OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
개 인플루 엔자 바이러스 (H3N2) 감염 개혈청 (G2-5)	원액	Cal. 1	640	0.333	0.17	양성	0.740	0.26	양성
	2배	Cal. 2	320	0.453	0.26	양성	0.851	0.30	양성
	4배	Cal. 3	160	0.465	0.27	양성	0.902	0.32	양성
	8배	Cal. 4	80	0.601	0.37	양성	1.087	0.38	양성
	16배	Cal. 5	40	0.754	0.48	양성	1.390	0.49	양성
	32배	Cal. 6	20	0.996	0.66	음성	1.542	0.54	양성
	64배	Cal. 7	10	1.269	0.86	음성	1.784	0.63	음성
	128배	Cal. 8	-	1.492	1.03	음성	2.323	0.82	음성

- ㉡ 시제품의 검출한계는 total 항체를 측정하는 국제 상용 제품보다 높은 검출 한계를 보였으며 HI 역가 최소 20배 이상의 검출 한계를 보였다.
- ⑤ 교차반응성 평가



- ㉔ CCV, CPV, CDV 혼합 백신을 접종한 개의 혈액을 이용하여 다른 질병 항체에 의한 교차반응성 유무를 확인하였다.
- ㉕ 시제품은 개의 타 질병 항혈청을 모두 음성으로 판정하였고 교차반응이 없는 것으로 확인되어 개 인플루엔자 바이러스 NS1 항체 검사에 적합함을 알 수 있었다.

No.	시료명	CIV NS1 Ab ELISA		
		OD	S/N	Result
1	NC1	2.085	0.74	음성
2	NC2	1.975	0.70	음성
3	NC3	2.322	0.82	음성

⑥ 임상적 민감도 평가

- ㉔ 검체 내역

No.	시료명	시료 내역
1	비클 G1-1	H3N2 공격접종 (Nasal route; 106.5 EID/mL) 후 10DPI에 채혈
2	비클 G1-2	
3	비클 G1-3	
4	G1-1	
5	G1-2	
6	G1-3	
7	G2-4	
8	G2-5	
9	G2-6	
10	G3-7	
11	G3-8	
12	G3-9	
13	G4-10	
14	G4-11	
15	G4-12	
16	G5-13	
17	G5-14	
18	G5-15	
19	G6-16	
20	G6-17	

- ㉕ 시료는 H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체들을 사용하여 임상적 민감도를 확인하였으며, HI Test와 상용화 ELISA (IDEXX社)의 결과와 비교하였다.
- ㉔ 개 인플루엔자 바이러스 접종 혈청에 대한 양성률

Kit 종류	Positive	Negative	Total	양성률 (%)
CIV NS1 Ab ELISA	20	0	20	100

- ㉔ 검체결과

No.	시료명	HI Titer	국제 상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NS1 Ab ELISA		
			OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
1	비글 G1-1	16	0.272	0.17	양성	1.591	0.56	양성
2	비글 G1-2	64	0.882	0.55	양성	1.541	0.54	양성
3	비글 G1-3	32	0.183	0.11	양성	1.607	0.57	양성
4	G1-1	1280	0.140	0.09	양성	1.520	0.54	양성
5	G1-2	1280	0.272	0.17	양성	1.047	0.37	양성
6	G1-3	1280	0.399	0.25	양성	1.682	0.59	양성
7	G2-4	1280	0.562	0.35	양성	1.684	0.59	양성
8	G2-5	640	0.499	0.31	양성	1.351	0.48	양성
9	G2-6	640	0.168	0.11	양성	1.400	0.49	양성
10	G3-7	80	0.204	0.13	양성	1.562	0.55	양성
11	G3-8	160	0.251	0.16	양성	1.480	0.52	양성
12	G3-9	160	0.176	0.11	양성	1.321	0.47	양성
13	G4-10	640	0.292	0.18	양성	1.054	0.37	양성
14	G4-11	1280	0.199	0.12	양성	1.392	0.49	양성
15	G4-12	1280	0.140	0.09	양성	1.626	0.57	양성
16	G5-13	640	0.434	0.27	양성	0.639	0.23	양성
17	G5-14	320	0.337	0.21	양성	0.734	0.26	양성
18	G5-15	320	0.517	0.32	양성	0.067	0.02	양성
19	G6-16	40	0.820	0.51	양성	0.065	0.02	양성
20	G6-17	40	0.691	0.43	양성	0.150	0.05	양성

㉞ 시제품은 개 인플루엔자 바이러스 H3N2을 공격접종한 개 검체에서 100% (n=20)의 양성률을 보였으며, HI 시험과는 100% (n=20) 일치하는 결과를 보였으며, total 항체를 측정하는 국제 상용 제품과는 95% (n=20)의 결과 일치률을 보이는 것으로 확인되었다.

㉟ 임상적 특이도 평가

㉠ 검체 내역

ㄱ 시료는 동물병원에서 수집한 개 혈청 검체들 중 HI Test와 상용화 ELISA (IDEXX社) 모두에서 음성으로 판정된 검체들과 개 인플루엔자 백신접종된 개 검체들을 사용하여 임상적 특이도를 확인하였다.

㉡ 개 음성 혈청에 대한 특이도

Kit 종류	Positive	Negative	Total	음성률 (%)
CIV NS1 Ab ELISA	5	65	70	92.9

㉢ 검체 결과

No.	group	시료명	HI Titer	국제 상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NS1 Ab ELISA		
				OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
1	동물병원 음성검체	제시	-	1.724	1.13	음성	1.750	0.62	음성
2		오복이	-	1.858	1.22	음성	2.085	0.74	음성
3		두부	-	1.314	0.86	음성	1.838	0.65	음성
4		No.1	-	0.937	0.61	음성	1.832	0.65	음성
5		No.8	-	1.395	0.91	음성	2.046	0.72	음성
6		No.11	-	1.594	1.04	음성	1.877	0.66	음성
7		No.19	-	0.967	0.63	음성	1.684	0.59	양성
8		No.20	-	1.355	0.89	음성	1.975	0.70	음성
9		골프	-	1.342	0.88	음성	1.897	0.67	음성
10		초코	-	1.291	0.84	음성	1.646	0.58	양성
11		수지	-	1.358	0.89	음성	1.950	0.69	음성
12		Df-19	-	0.979	0.64	음성	2.322	0.82	음성
13		Df-24	-	1.709	1.12	음성	1.724	0.61	음성

14		Df-25	-	1.682	1.10	음성	1.678	0.59	양성
15		Df-27	-	1.466	0.96	음성	1.595	0.56	양성
16		Df-28	-	1.403	0.92	음성	1.736	0.61	양성
17		Df-31	-	1.349	0.88	음성	2.147	0.76	음성
18		Df-38	-	1.626	1.06	음성	1.764	0.62	음성
19		Df-39	-	1.070	0.70	음성	1.818	0.64	음성
20		Df-41	-	1.299	0.85	음성	1.685	0.59	양성
21		Df-42	-	1.033	0.68	음성	2.287	0.81	음성
22		Df-48	-	0.920	0.60	음성	1.956	0.69	음성
23		Df-53	-	2.284	1.49	음성	2.003	0.71	음성
24		Df-54	-	1.787	1.17	음성	2.001	0.71	음성
25		Df-55	-	1.569	1.03	음성	2.207	0.78	음성
26		58띠리	-	1.166	0.76	음성	1.893	0.67	음성
27		59	-	1.339	0.88	음성	1.964	0.69	음성
28		쿠늘	-	1.628	1.07	음성	2.322	0.82	음성
29		뽕미	-	1.752	1.15	음성	1.764	0.62	음성
30		Df-77	-	1.650	1.08	음성	2.322	0.82	음성
31		Df-81	-	1.467	0.96	음성	1.764	0.62	음성
32		Df-83	-	1.421	0.93	음성	1.818	0.64	음성
33		Df-84	-	1.406	0.92	음성	1.942	0.69	음성
34		Df-85	-	1.773	1.16	음성	2.185	0.77	음성
35		Df-88	-	1.299	0.85	음성	2.340	0.83	음성
36		Df-89	-	1.009	0.66	음성	2.123	0.75	음성
37		Df-90	-	1.635	1.07	음성	2.419	0.85	음성
38		Df-92	-	1.605	1.05	음성	2.137	0.75	음성
39		Df-93	-	1.803	1.18	음성	1.750	0.62	음성
40		Df-95	-	1.131	0.74	음성	2.085	0.74	음성
41		Df-96	-	1.360	0.89	음성	1.838	0.65	음성
42		Df-98	-	1.803	1.18	음성	1.832	0.65	음성
43		Df-101	-	1.773	1.16	음성	2.046	0.72	음성
44		Df-102	-	1.543	1.01	음성	1.877	0.66	음성
45		Df-103	-	1.482	0.97	음성	1.975	0.70	음성
46		Df-106	-	1.085	0.71	음성	1.897	0.67	음성
47		Df-107	-	1.559	1.02	음성	2.287	0.81	음성
48		Df-111	-	1.085	0.71	음성	1.956	0.69	음성
49		Df-112	-	1.284	0.84	음성	2.003	0.71	음성
50		Df-114	-	1.406	0.92	음성	2.001	0.71	음성
51		Df-116	-	1.345	0.88	음성	2.207	0.78	음성
52		Df-117	-	1.421	0.93	음성	1.893	0.67	음성
53		No.27	-	1.406	0.92	음성	1.964	0.69	음성
54		No.28	-	1.711	1.12	음성	2.322	0.82	음성
55		No.30	-	1.849	1.21	음성	1.764	0.62	음성
56		No.31	-	1.803	1.18	음성	1.736	0.61	음성
57		No.36	-	1.161	0.76	음성	2.147	0.76	음성
58		No.37	-	1.314	0.86	음성	1.764	0.62	음성
59		No.40	-	1.024	0.67	음성	1.818	0.64	음성
60		No.43	-	1.803	1.18	음성	2.322	0.82	음성
61		No.45	-	1.880	1.23	음성	1.764	0.62	음성
62		No.46	-	1.681	1.10	음성	1.818	0.64	음성
63	CIV 백신검체	IM50-1	40	0.609	0.40	양성	1.942	0.69	음성
64		IM50-3	40	1.325	0.87	음성	2.185	0.77	음성
65		IM50-8	80	0.614	0.40	양성	2.340	0.83	음성
66		M25-2	40	0.473	0.31	양성	2.123	0.75	음성
67		M25-8	40	0.437	0.29	양성	2.419	0.85	음성
68		M50-1	40	0.370	0.24	양성	2.137	0.75	음성
69		M50-8	40	0.970	0.64	음성	1.975	0.70	음성
70		M50-10	40	2.128	1.39	음성	1.897	0.67	음성

㉔ 동물병원에서 수집한 음성 혈청 검체 (HI test와 total 항체를 측정하는 국제 상용 제품(IDEXX社))에서는 91.9% (n=62), 개 인플루엔자 백신접종 검체 에서는 100% (n=8)의 특이도를 보여 전체적으로는 92.9% (n=70)의 특이도를 나타냈다.

⑧ 판정기준 (cut-off) 설정

㉕ 검체내역

ㄱ 감염혈청 (H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청)과 비감염혈청 [동물병원에서 수집한 개 음성 혈청 검체들(HI Test와 상용화 ELISA (IDEXX社)) 및 개 인플루엔자 백신접종 검체]을 대상으로 판정기준(Cut-off)을 설정하였다.

ㄴ TG-ROC 분석을 이용한 판정기준 설정 (양성검체)

S/N	No. of Samples	Group		Sensitivity (%)
		P <sup>1)</sup>	N <sup>2)</sup>	
0.0	20	20	0	0.0
0.1	20	17	3	15.0
0.2	20	17	3	15.0

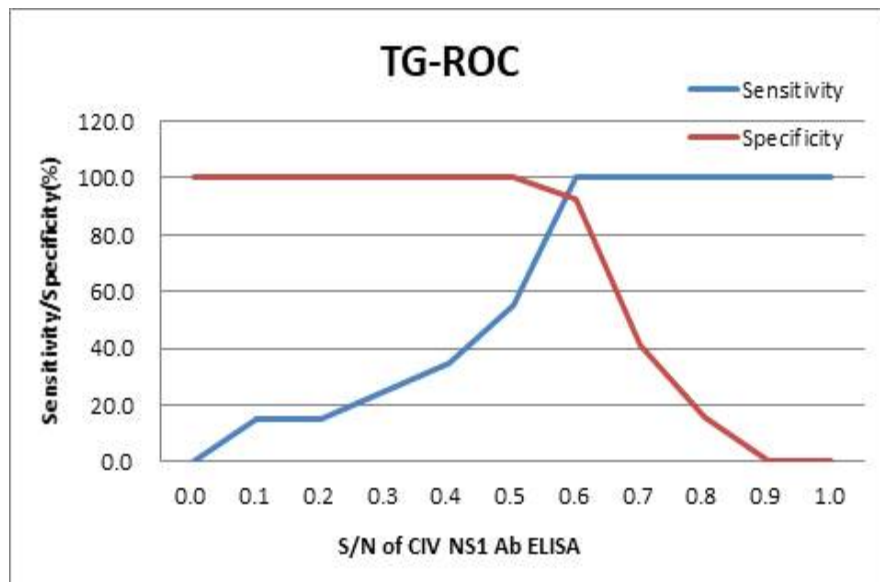
0.3	20	15	5	25.0
0.4	20	13	7	35.0
0.5	20	9	11	55.0
0.6	20	0	20	100.0
0.7	20	0	20	100.0
0.8	20	0	20	100.0
0.9	20	0	20	100.0
1.0	20	0	20	100.0

<sup>1)</sup> No. of positive serum <sup>2)</sup> No. of negative serum

ㄷ TG-ROC 분석을 이용한 판정기준 설정 (음성검체)

S/N	No. of Samples	Group		Specificity (%)
		P <sup>1)</sup>	N <sup>2)</sup>	
0.0	70	70	0	100.0
0.1	70	70	0	100.0
0.2	70	70	0	100.0
0.3	70	70	0	100.0
0.4	70	70	0	100.0
0.5	70	70	0	100.0
0.6	70	65	5	92.9
0.7	70	29	41	41.4
0.8	70	11	59	15.7
0.9	70	0	70	0.0
1.0	70	0	70	0.0

<sup>1)</sup> No. of positive serum <sup>2)</sup> No. of negative serum



<TG-ROC 그래프>

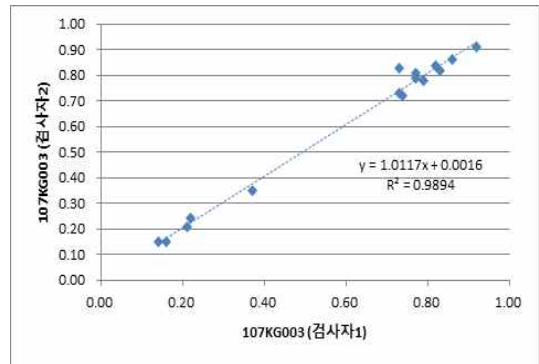
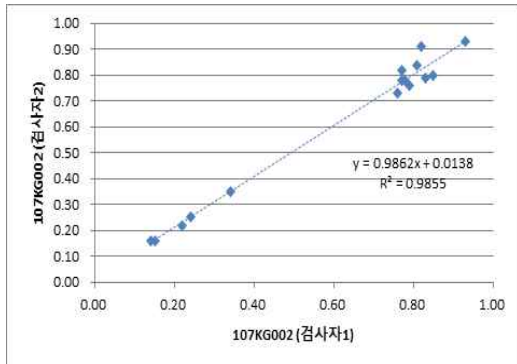
ㄷ 시제품은 TG-ROC 분석결과, S/N값 0.60에서 민감도 100%, 특이도 92.9%를 나타내어 가장 적합한 판정 기준을 나타냈다.

⑨ 재현성 평가

㉞ 시제품에서 양/음성으로 판정된 표준검체 (15종)을 사용하여 다른 검사자가 각각 다른 검사일에 다른 장소에서 2종의 시제품을 3회 검사하고 S/N값의 상관계수를 분석하여 재현성을 확인하였다.

시료 번호	시료명	107KG002 (검사자 1)			107KG002 (검사자 2)		
		Mean OD	Mean S/N	결과	Mean OD	Mean S/N	결과
S01	G1-1	0.168	0.14	P	0.173	0.16	P
S02	G1-2	0.413	0.34	P	0.469	0.35	P
S03	G1-3	0.270	0.22	P	0.271	0.22	P
S04	G5-15	0.187	0.15	P	0.198	0.16	P
S05	G5-16	0.298	0.24	P	0.313	0.25	P
S06	사랑이	1.829	0.82	N	1.903	0.91	N
S07	백두	1.720	0.77	N	1.811	0.82	N
S08	쿤	1.893	0.85	N	1.792	0.80	N
S09	No.2	2.066	0.93	N	2.015	0.93	N
S10	No.7	1.717	0.77	N	1.763	0.78	N
S11	Df-31	1.691	0.76	N	1.576	0.73	N
S12	Df-34	1.843	0.83	N	1.768	0.79	N
S13	Df-42	1.801	0.81	N	1.864	0.84	N
S14	Df-45	1.763	0.79	N	1.653	0.76	N
S15	Df-55	1.738	0.78	N	1.754	0.78	N
	PC	0.267	0.22	P	0.285	0.23	P
	NC	1.806	0.81	N	1.790	0.81	N

시료 번호	시료명	107KG003 (검사자 1)			107KG003 (검사자 2)		
		Mean OD	Mean S/N	결과	Mean OD	Mean S/N	결과
S01	G1-1	0.173	0.16	P	0.160	0.15	P
S02	G1-2	0.521	0.37	P	0.463	0.35	P
S03	G1-3	0.261	0.21	P	0.257	0.21	P
S04	G5-15	0.169	0.14	P	0.158	0.15	P
S05	G5-16	0.278	0.22	P	0.301	0.24	P
S06	사랑이	1.830	0.82	N	1.903	0.84	N
S07	백두	1.731	0.77	N	1.694	0.79	N
S08	쿤	1.906	0.86	N	1.981	0.86	N
S09	No.2	2.001	0.92	N	1.979	0.91	N
S10	No.7	1.586	0.74	N	1.384	0.72	N
S11	Df-31	1.583	0.73	N	1.579	0.73	N
S12	Df-34	1.781	0.79	N	1.697	0.78	N
S13	Df-42	1.834	0.83	N	1.731	0.82	N
S14	Df-45	1.732	0.77	N	1.813	0.81	N
S15	Df-55	1.840	0.73	N	1.861	0.83	N
	PC	0.280	0.22	P	0.268	0.22	P
	NC	1.782	0.80	N	1.762	0.81	N



<검사 간 S/N값 상관성 분석결과>

㉔ 표준물질을 사용하여 2개의 시제품을 검사한 결과, 검사 간 상관계수( $r^2$ )는 모두 0.98로 높은 상관성을 보였으며, 판정 값에도 차이가 없어 시제품의 재현성이 우수

한 것으로 판단되었다.

(나) 개 인플루엔자 감염 항체 진단용 키트 [H3N2 recombinant NS1 candidate 및 NS1 specific mAb을 이용한 blocking immunochromatographic assay]의 성능 평가


① 제품사진

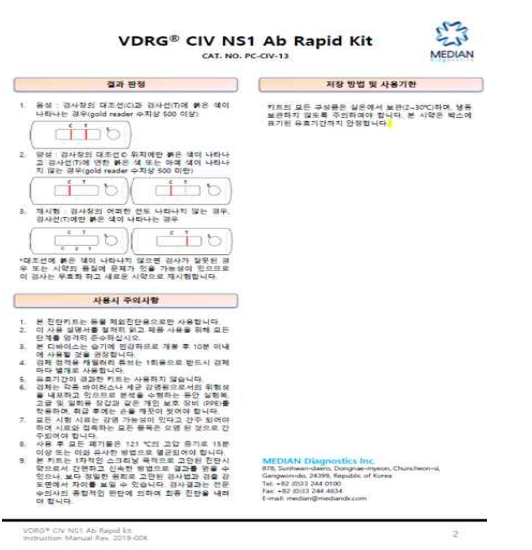




번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	CIV NS1 검사 디바이스	10개	방습제를 포함하고 파우치포장으로 이루어진 디바이스
2	검체 희석액	10개	스크류캡 튜브에 담긴 무색 내지 미황색 투명한 액체
3	드롭퍼	10개	지퍼백에 포장된 반투명한 일회용 드롭퍼

② 제품 설명서






③ 최저검출한계 (Limit of detection, LOD) 비교

- ㄱ 양성 표준검체는 H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체 (G2-5)를 음성 혈청으로 2진 희석한 후 진단키트의 최저검출한계를 확인하였으며, HI (Hemagglutination inhibition) Test 및 상용화 ELISA (IDEXX사)와 비교하였다.
- ㄴ cut-off는 reader 수치 500 이하를 양성 (500 초과 음성)으로 판정하였다

희석배수	HI Titer	IDEXX ELISA		NS1 Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
2	320	0.26	+	348	+
4	160	0.27	+	427	+
8	80	0.37	+	489	+
16	40	0.48	+	574	-
32	20	0.66	-	725	-


희석 배수	2	4	8	16	32
사진					
결과	348	427	489	574	725

ㄷ 시제품은 HI 역가 80까지 검출가능 하고 타사 NP 항체 ELISA (IDEXX社)와 비교 시 2배 정도 낮은 감도를 나타냈다.

④ 음성 표준 검체 특이도 평가

- ㄱ 동물병원에서 수집한 개 혈청 검체들 중 HI Test와 상용화 ELISA (IDEXX社) 모두에서 음성으로 판정된 검체 5건을 이용하여 rapid kit의 특이도를 확인하였다.
- ㄴ cut-off는 reader 수치 500 이하를 양성(500 초과 음성)으로 판정하였다.

No.	Name	IDEXX ELISA		NS1 Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
1	Df-41	0.85	-	781	-
2	Df-46	0.71	-	768	-
3	Df-48	0.60	-	664	-
4	Df-53	1.49	-	687	-
5	Df-54	1.17	-	680	-


검체	Df-41	Df-46	Df-48	Df-53	Df-54
사진					
결과	781	768	664	687	680

ㄷ 음성 표준검체 5건 모두 reader 수치 500 이상으로 표현되어 음성으로 판정하였다.

⑤ 교차반응성 평가

- ㄱ CCV, CPV, CDV 혼합 백신을 접종한 애완건의 혈액을 이용하여 교차반응성을 확인하였다
- ㄴ cut-off는 reader 수치 500 이하를 양성(500 초과 음성)으로 판정하였다.

No.	Name	IDEXX ELISA		NS1 Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
1	NC1	1.15	-	874	-
2	NC2	0.96	-	623	-
3	NC3	1.2	-	697	-

검체	NC1	NC2	NC3
사진			
결과	874	623	697

ㄷ 3건의 검체 모두 음성 반응이 나타났다.

ㄹ CCV, CPV, CDV의 항체를 포함하고 있는 검체에서 음성으로 나타나 교차반응이 없는 것으로 확인 되었다.

⑥ 재현성 평가

ㄱ 양성 표준검체 중 G2-5(HI Titer 640) 검체를 이용하여 3회 반복 시험을 통해 재현성을 확인하였다.

ㄴ cut-off는 reader 수치 500 이하를 양성(500 초과 음성)으로 판정하였다.

희석 배수	2	4	8	16	32	희석 배수	2	4	8	16	32	희석 배수	2	4	8	16	32
사진																	
결과	348	427	489	574	725	결과	372	440	468	559	693	결과	388	429	470	581	714

ㄷ 3회 모두 희석배수 8배까지 양성으로 검출하여 재현성 있음을 확인하였다.

⑦ 임상적 민감도 평가

ㄱ 시료는 H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체 (20종)을 이용하여 rapid kit의 민감도를 확인하였다.

ㄴ cut-off는 reader 수치상 500 이하(500 초과 음성)를 양성으로 판정하였다.

No.	Name	IDEXX ELISA	NS1 Rapid kit
1	비글 G1-1	0.32	392
2	비글 G1-2	0.51	463
3	비글 G1-3	0.43	415
4	G1-1	0.17	394
5	G1-2	0.55	570
6	G1-3	0.11	454
7	G2-4	0.09	488
8	G2-5	0.17	348
9	G2-6	0.25	424
10	G3-7	0.35	374
11	G3-8	0.31	475
12	G3-9	0.10	504
13	G4-10	0.13	223
14	G4-11	0.16	353
15	G4-12	0.11	210
16	G5-13	0.18	494
17	G5-14	0.12	351
18	G5-15	0.09	331
19	G6-16	0.27	334
20	G6-17	0.21	369

ㄷ 20건의 검체 중 18건을 양성으로 판정하여 90%의 민감도를 보였다.

⑧ 임상적 특이도 평가

ㄱ 시료는 동물병원에서 수집한 개 혈청 검체들 중 HI Test와 상용화 ELISA (IDEXX社) 모두에서 음성으로 판정된 검체들과 개 인플루엔자 백신접종된 개 검체들을 이용하여 rapid kit의 특이도를 확인하였다.

ㄴ cut-off는 reader 수치상 500 이하를 양성(500 초과 음성)으로 판정하였다.



No.	Name	IDEXX ELISA	NS1 Rapid kit
1	제시	1.13	624
2	오복이	1.22	619
3	두부	0.86	749
4	No.1	0.61	985
5	No.8	0.91	870
6	No.11	1.04	515
7	No.19	0.63	568
8	No.20	0.89	725
9	골프	0.88	520
10	초코	0.84	533
11	수지	0.89	556
12	Df-19	0.64	334
13	Df-24	1.12	1216
14	Df-25	1.10	641
15	Df-27	0.96	314
16	Df-28	0.92	781
17	Df-31	0.88	768
18	Df-38	1.06	664
19	Df-39	0.70	687
20	Df-41	0.85	680
21	Df-42	0.68	893
22	Df-48	0.60	755
23	Df-53	1.49	820
24	Df-54	1.17	692
25	Df-55	1.03	546
26	58띠리	0.76	823
27	59	0.88	793
28	쿠돌	1.07	828
29	뽕미	1.15	742
30	Df-77	1.08	911
31	Df-81	0.96	631
32	Df-83	0.93	774
33	Df-84	0.92	599
34	Df-85	1.16	606
35	Df-88	0.85	952
36	Df-89	0.66	598
37	Df-90	1.07	870
38	Df-92	1.05	935
39	Df-93	1.18	877
40	Df-95	0.74	773
41	Df-96	0.89	764
42	Df-98	1.18	881
43	Df-101	1.16	946
44	Df-102	1.01	885
45	Df-103	0.97	765
46	Df-106	0.71	404
47	Df-107	1.02	735
48	Df-111	0.71	653
49	Df-112	0.84	837
50	Df-114	0.92	890
51	Df-116	0.88	422
52	Df-117	0.93	624
53	No.27	0.92	789
54	No.28	1.12	650
55	No.30	1.21	831
56	No.31	1.18	744

No.	Name	IDEXX ELISA	NS1 Rapid kit
57	No.36	0.76	377
58	No.37	0.86	697
59	No.40	0.67	855
60	No.43	1.18	592
61	No.45	1.23	726
62	No.46	1.10	562
63	IM50-1	0.40	737
64	IM50-3	0.87	893
65	IM50-8	0.40	748
66	M25-2	0.31	816
67	M25-8	0.29	577
68	M50-1	0.24	823
69	M50-8	0.64	695
70	M50-10	1.39	717

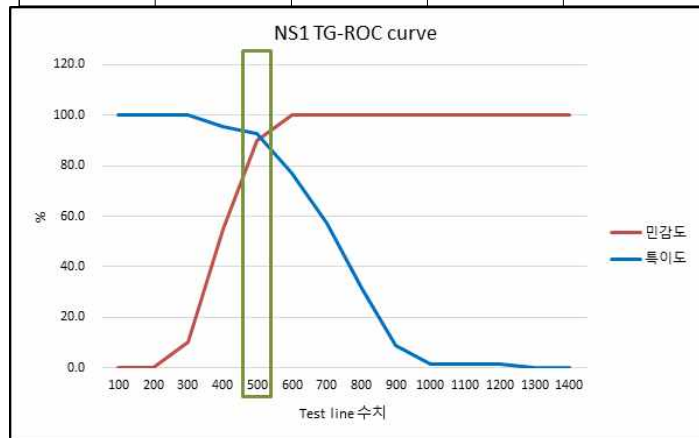
ㄷ 70건의 검체 중 65건을 음성으로 판정하여 92.9%의 특이도를 보였다.

ㄹ 백신 접종으로 NP 양성인 검체에서도 NP와 교차없이 NS1 음성으로 판정되었다.

⑨ 임상적 성능 요약

ㄱ 검체 총 90건을 이용하여 rapid kit의 반응성을 확인한 결과 cut-off를 500으로 설정했을 때 민감도 90%(18/20건), 특이도 92.9%(65/70건)로 나타났다.

cut-off	양성(건)	음성(건)	민감도	특이도
100			0.0	100.0
200			0.0	100.0
300	2		10.0	100.0
400	9	3	55.0	95.7
500	7	2	90.0	92.9
600	2	11	100.0	77.1
700		14	100.0	57.1
800		18	100.0	31.4
900		16	100.0	8.6
1000		5	100.0	1.4
1100			100.0	1.4
1200			100.0	1.4
1300		1	100.0	0.0
1400			100.0	0.0
합계	20	70		



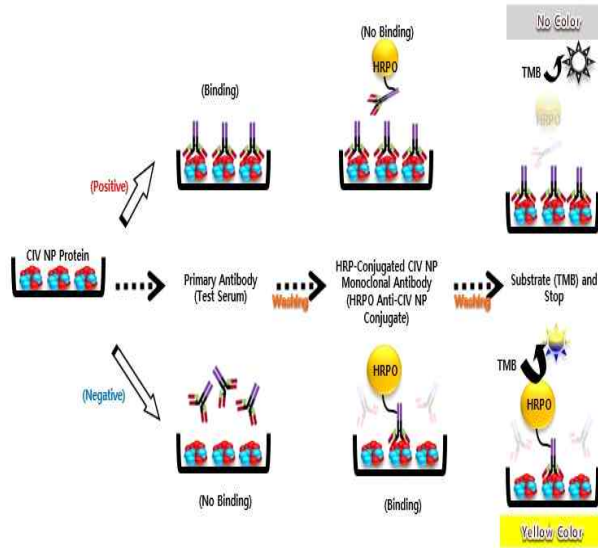
(다) 재조합 NP(nucleoprotein) 및 NP 특이 단클론항체를 이용한 진단키트 제품화 및 성

능평가 및 인허가 서류 작성

① 개 인플루엔자 total 항체 진단용 키트 (CIV NP Ab ELISA)의 성능 평가

㉔ 제품 설명

ㄱ blocking 항체 ELISA 방식의 kit로써, 96well plate에 코팅되어 있는 개 인플루엔자 바이러스 NP 재조합 항원 (Baculovirus)과 검체를 반응시키면 검체 내에 NP에 대한 항체가 있는 경우 코팅 항원에 반응하여 detector Ab (3B19)반응이 나타나지 않는 원리이다.



<Blocking ELISA kit assay 반응원리>

㉔ 제품 사진



번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	CIVNP 항원 흡착 플레이트 (CIVNP Antigen Coated Plate)	5장	방수재를 포함하고 파우치 포장으로 이루어진 96-well plate
2	10X 세척액 (10X Washing Buffer)	1개	무색 투명한 액체
3	희석액 (Dilution Buffer)	1개	작은 투명한 액체
4	HRPO Anti-CIVNP Conjugate	1개	갈색액의 액체
5	양성대조 (Positive Control)	1개	작은액의 액체
6	음성대조 (Negative Control)	1개	갈색액의 액체
7	발색제 (TMB Substrate)	1개	무색 투명한 액체
8	정지액 (Stop Solution)	1개	무색 투명한 액체

㉔ 제품 설명서

**VDPro® 개 인플루엔자 바이러스 NP 항체 ELISA**  
(VDPro® CIV NP Ab ELISA)  
Cal. No. EC-CIV-01

**1. 제품의 개요 및 원리**

VDPro® CIV NP Ab ELISA 제품은 제조업체 개 인플루엔자 바이러스 (CIV) 항원을 기반으로 한 blocking ELISA를 이용한 제조 재료 잔류물 세균으로 CIV에 의해 생성되는 개 폐쇄 장사에 적용할 수 있습니다. CIV nucleoprotein (NP) 항원이 고정화된 플라스틱에 고정된 항원을 함유한 주 용액으로 결합된 HRPO Anti-CIV NP conjugate를 반응시키고 신속하게 결과를 측정합니다. 결합 상태 하의 항체가 주 용액인 CIV NP 항원 특이적인 anti-RO Anti-CIV NP conjugate에 대한 반응이 차단되어 항체가 고정된 플라스틱에 결합되어 있습니다. 결합된 항체는 음성 대조에 대한 반응이 억제되어, sample to negative control ratio를 사용하여 판독합니다.

**2. 제품의 구성**

Reagents	192tests	480tests
1) CIV NP 항원 흡착 플라스틱	2 plates	3 plates
2) 10X 세척액 (10X Washing Buffer)	250mL X 1	240mL X 1
3) 완충액 (Dilution Buffer)	120mL X 1	240mL X 1
4) 양성대조 (Positive Control)	3.0mL X 1	7.0mL X 1
5) 음성대조 (Negative Control)	3.0mL X 1	7.0mL X 1
6) HRPO Anti-CIV NP Conjugate	40mL X 1	70mL X 1
7) 발색제 (TMB Substrate)	30mL X 1	70mL X 1
8) 정지액 (Stop Solution)	20mL X 1	40mL X 1
9) 사용설명서	1M	1M

**3. 검사 필요장비 및 시약**

- 1) 마이크로 보정 및 타이머
- 2) 멸균 용액 용기
- 3) 96웰 또는 12 채널 마이크로 보정
- 4) 종유수
- 5) 판독기 ELISA reader (450nm)
- 6) ELISA plate를 처음 또는 연속적으로 세척기

**4. 시약 및 시료의 준비**

- 1) 1X 세척액 (1X Washing Buffer) - 20mL의 10X 세척액 용액에 180mL의 종유수나 물 혼합하여 사용합니다.
- 2) 완충액 ELISA plate 1당에 약 200mL의 1X Washing Buffer가 소요됩니다.
- 3) Substrate 준비
- 4) 발색제 (TMB Substrate)는 사용 전에 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 5) 정지액 (Stop Solution)은 사용 전에 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 6) 발색제는 발색 온도를 20°C 이하로 낮추고, 시료는 발색제와 함께 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 7) 발색제는 15분 후 2.0mL의 정지액을 추가하여 반응을 중지시킵니다.
- 8) 발색제는 15분 후 2.0mL의 정지액을 추가하여 반응을 중지시킵니다.
- 9) 발색제는 15분 후 2.0mL의 정지액을 추가하여 반응을 중지시킵니다.

**5. 사용 시 유의사항**

- 1) 무균 조건이 아닌 시약은 사용하지 않습니다.
- 2) 제조업체가 다른 제조업체의 시약을 사용하지 않습니다.
- 3) 검사에 사용되는 용액, 기구 등 모든 용기는 멸균 상태로 유지해야 합니다.
- 4) 반응의 경우, 모든 시료 용액 상온 혼합 후 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 5) ELISA 판독기는 450nm 파장에서 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 6) Stop Solution은 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 7) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 8) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 9) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 10) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 11) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 12) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 13) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.
- 14) 시약의 사용 시 교차반응을 방지하기 위해, 사용된 용기는 20분 동안 실온에서 배양해야 합니다.

**6. 검사 순서**

- 1) 모든 구성품을 실온에서 평온시키고, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 2) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 3) 37°C에서 1시간 반응시킵니다.
- 4) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 5) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 6) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 7) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 8) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 9) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.
- 10) 용액이 모두 균일하게 혼합된 후, 용액이 모두 균일하게 혼합됩니다.

**7. 결과 판독**

- 1) 표준선 평가 (Validation)
- 2) 양성대조 (Positive Control)
- 3) 발색제 OD 값을 0.3 이상
- 4) 음성대조 (Negative Control)
- 5) 발색제 OD 값을 0.5 이상

**QUICK PROTOCOL**

**가속판독 및 주의**

속독판독 내 샘플은 200-800nm 파장에서 측정해야 하며, 가속판독은 권장하지 않습니다.

판독기 (예: 메디안 디스텍스 모델 450) 200-800nm 파장에서 15분 동안 실온에서 배양해야 합니다. (예: 450nm 파장에서 15분 동안 실온에서 배양)

mediana@mediandis.com

㉔ 최저검출한계 (Limit of detection, LOD) 평가

ㄱ 양성 표준검체는 H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체 (G2-5)를 음성 혈청으로 2진 희석한 후 진단키트의 최저검출한계를 확인하였으며, HI (Hemagglutination inhibition) Test 및 상용화 ELISA (IDEXX사)와 비교하였다

Sample	샘플 희석배수	시료명	HI Titer	국제 상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NP Ab ELISA		
				OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
개 인플루엔자 바이러스(H3N2) 감염 개혈청 (G2-5)	원액	Cal. 1	640	0.333	0.17	양성	0.068	0.06	양성
	2배	Cal. 2	320	0.453	0.26	양성	0.077	0.07	양성
	4배	Cal. 3	160	0.465	0.27	양성	0.090	0.08	양성
	8배	Cal. 4	80	0.601	0.37	양성	0.120	0.11	양성
	16배	Cal. 5	40	0.754	0.48	양성	0.214	0.20	양성
	32배	Cal. 6	20	0.996	0.66	음성	0.403	0.37	양성
	64배	Cal. 7	10	1.269	0.86	음성	0.675	0.62	음성
	128배	Cal. 8	-	1.492	1.03	음성	0.895	0.82	음성

ㄴ 시제품은 국제 상용 제품보다 높은 검출 한계를 보였으며 HI 역가 20배의 검출 한계를 보였다.

㉔ 교차반응성 평가

ㄱ CCV, CPV, CDV 혼합 백신을 접종한 개의 혈액을 이용하여 다른 질병 항체에 의한 교차반응성 유무를 확인하였다.

No.	시료명	CIV NP Ab ELISA		
		OD	S/N	Result
1	NC1	0.951	0.85	음성
2	NC2	0.973	0.87	음성
3	NC3	0.989	0.89	음성

ㄴ 시제품은 교차반응이 없는 것으로 확인되어 개 인플루엔자 바이러스 NP 항체 검

사에 적합함을 알 수 있었다.

㉞ 임상적 민감도 평가

ㄱ 검체내역

No.	시료명	시료 내역
1	G1-1	H3N2 공격접종 (Nasal route; 10 <sup>6.5</sup> EID/mL) 후 10DPI에 채혈
2	G1-2	
3	G1-3	
4	G2-4	
5	G2-5	
6	G2-6	
7	G3-7	
8	G3-8	
9	G3-9	
10	G4-10	
11	G4-11	
12	G4-12	
13	G5-13	
14	G5-14	
15	G5-15	
16	G6-16	
17	G6-17	
18	도도	동물병원 검체
19	No.5	
20	No.7	
21	No.9	
22	No.10	
23	No.14	
24	No.17	
25	No.21	
26	둥지 1	
27	둥지 2	
28	꿩지	
29	슈디	
30	사랑	
31	Df-15	
32	Df-20	
33	보리	
34	모리	
35	Df-26	
36	Df-32	
37	Df-33	
38	Df-35	
39	Df-36	
40	Df-37	
41	Df-43	
42	Df-44	
43	Df-47	
44	Df-49	
45	Df-50	
46	Df-51	
47	Df-52	
48	Df-56	
49	Df-57	
50	60	
51	Df-58	
52	Df-61	
53	Df-62	
54	Df-64	
55	Df-65	
56	Df-68	
57	Df-72	
58	Df-76	
59	Df-78	
60	Df-79	
61	No.22	
62	No.25	
63	No.26	
64	No.35	
65	No.38	
66	No.44	
67	No.53	
68	No.54	
69	No.57	
70	No.59	
71	No.60	
72	No.62	
73	No.65	
74	No.67	
75	No.68	

ㄴ H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체들과 동물병원 검체들 중 HI Test에서 양성으로 판정된 검체들만을 사용하여 임상적 민감도를 확인하였으

며, 상용화 ELISA (IDEXX사)의 결과와 비교하였다.

ㄷ 개 인플루엔자 바이러스 양성 혈청에 대한 양성률

Kit 종류	Positive	Negative	Total	양성률(%)
CIV NP Ab ELISA	70	5	75	93.3

ㄹ 검체 결과

No.	시료명	HI Titer	국제 상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NP Ab ELISA		
			OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
1	G1-1	1280	0.282	0.18	양성	0.111	0.09	양성
2	G1-2	1280	0.892	0.58	양성	0.475	0.39	양성
3	G1-3	1280	0.183	0.12	양성	0.181	0.15	양성
4	G2-4	1280	0.153	0.10	양성	0.555	0.45	양성
5	G2-5	640	0.282	0.18	양성	0.370	0.30	양성
6	G2-6	640	0.399	0.26	양성	0.112	0.09	양성
7	G3-7	80	0.572	0.37	양성	0.127	0.10	양성
8	G3-8	160	0.499	0.33	양성	0.130	0.11	양성
9	G3-9	160	0.168	0.11	양성	0.114	0.09	양성
10	G4-10	640	0.204	0.13	양성	0.111	0.09	양성
11	G4-11	1280	0.307	0.20	양성	1.012	0.82	양성
12	G4-12	1280	0.186	0.12	양성	0.397	0.32	양성
13	G5-13	640	0.292	0.19	양성	0.163	0.13	양성
14	G5-14	320	0.199	0.13	양성	0.091	0.07	양성
15	G5-15	320	0.140	0.09	양성	0.071	0.06	양성
16	G6-16	40	0.434	0.28	양성	0.180	0.15	양성
17	G6-17	40	0.347	0.23	양성	0.490	0.40	양성
18	도도	32	0.442	0.29	양성	0.081	0.07	양성
19	No.5	16	0.733	0.48	양성	0.413	0.34	양성
20	No.7	16	0.430	0.28	양성	0.270	0.22	양성
21	No.9	16	0.654	0.43	양성	0.186	0.15	양성
22	No.10	32	0.365	0.24	양성	0.206	0.17	양성
23	No.14	32	0.880	0.58	양성	0.705	0.57	양성
24	No.17	16	0.633	0.41	양성	0.229	0.19	양성
25	No.21	16	0.519	0.34	양성	0.170	0.14	양성
26	둥지 1	256	0.169	0.11	양성	0.275	0.22	양성
27	둥지 2	256	0.178	0.12	양성	0.526	0.43	양성
28	꿀지	32	0.818	0.54	양성	0.959	0.78	양성
29	슈디	256	0.174	0.11	양성	0.187	0.15	양성
30	사랑	64	0.178	0.12	양성	0.197	0.16	양성
31	Df-15	64	0.203	0.13	양성	0.187	0.15	양성
32	Df-20	32	0.265	0.17	양성	0.298	0.24	양성
33	보리	32	0.211	0.14	양성	0.238	0.19	양성
34	모리	64	0.403	0.26	양성	0.470	0.38	양성
35	Df-26	32	0.529	0.35	양성	0.374	0.30	양성
36	Df-32	16	0.553	0.36	양성	0.468	0.38	양성
37	Df-33	128	0.264	0.17	양성	0.172	0.14	양성
38	Df-35	16	0.251	0.16	양성	0.480	0.39	양성
39	Df-36	64	0.290	0.19	양성	0.168	0.14	양성
40	Df-37	32	0.474	0.31	양성	0.179	0.15	양성
41	Df-43	64	0.333	0.22	양성	0.067	0.05	양성
42	Df-44	64	0.812	0.53	양성	0.168	0.14	양성
43	Df-47	32	0.232	0.15	양성	0.373	0.30	양성
44	Df-49	64	0.216	0.14	양성	0.069	0.06	양성
45	Df-50	16	0.799	0.52	양성	0.475	0.39	양성
46	Df-51	32	0.196	0.13	양성	0.549	0.45	양성
47	Df-52	128	0.180	0.12	양성	0.603	0.49	양성
48	Df-56	64	0.157	0.10	양성	0.350	0.28	양성
49	Df-57	32	0.236	0.15	양성	0.457	0.37	양성
50	60	32	0.184	0.12	양성	0.119	0.10	양성
51	Df-58	16	0.290	0.19	양성	0.309	0.25	양성
52	Df-61	64	0.153	0.10	양성	0.595	0.48	양성
53	Df-62	32	0.199	0.13	양성	0.608	0.49	양성
54	Df-64	64	0.565	0.37	양성	0.255	0.21	양성
55	Df-65	64	0.183	0.12	양성	0.168	0.14	양성
56	Df-68	64	0.168	0.11	양성	0.424	0.34	양성
57	Df-72	32	0.214	0.14	양성	0.385	0.31	양성
58	Df-76	16	0.214	0.14	양성	0.177	0.14	양성
59	Df-78	32	0.290	0.19	양성	0.255	0.21	양성
60	Df-79	32	0.229	0.15	양성	0.418	0.34	양성
61	No.22	32	0.443	0.29	양성	0.275	0.22	양성
62	No.25	32	0.214	0.14	양성	0.397	0.32	양성
63	No.26	40	0.199	0.13	양성	1.184	0.96	양성
64	No.35	80	0.168	0.11	양성	0.467	0.38	양성
65	No.38	40	0.458	0.30	양성	0.520	0.42	양성
66	No.44	40	0.290	0.19	양성	0.141	0.11	양성
67	No.53	40	0.275	0.18	양성	0.281	0.23	양성
68	No.54	40	0.810	0.53	양성	0.989	0.80	양성
69	No.57	40	0.520	0.34	양성	0.941	0.76	양성
70	No.59	16	0.367	0.24	양성	0.067	0.05	양성

71	No.60	128	0.397	0.26	양성	0.168	0.14	양성
72	No.62	16	0.688	0.45	양성	0.373	0.30	양성
73	No.65	32	0.565	0.37	양성	0.069	0.06	양성
74	No.67	64	0.183	0.12	양성	0.475	0.39	양성
75	No.68	128	0.199	0.13	양성	0.549	0.45	양성

□ 시제품은 개 인플루엔자 바이러스 H3N2을 공격접종한 개 검체에서는 94.1% (n=17), 동물병원 개 검체에서는 93.1% (n=58)의 민감도를 보여 전체적으로는 93.3% (n=75)의 민감도를 보이는 것으로 확인되었다.

㉔ 임상적 특이도 평가

ㄱ 동물병원에서 수집한 개 혈청 검체들 중 HI Test에서 음성으로 판정된 검체들만을 사용하여 임상적 특이도를 확인하였다.

ㄴ 동물병원 개 음성 혈청에 대한 특이도

Kit 종류	Positive	Negative	Total	음성률 (%)
CIV NP Ab ELISA	0	70	70	100

ㄷ 검체 결과

No.	시료명	HI Titer	국제 상용 제품 (IDEXX ELISA)			CIV NP Ab ELISA		
			OD	S/N	Result	OD	S/N	Result
1	제시	-	1.724	1.13	음성	1.216	1.09	음성
2	오복이	-	1.858	1.22	음성	1.301	1.17	음성
3	두부	-	1.314	0.86	음성	1.091	0.98	음성
4	No.1	-	0.937	0.61	음성	0.962	0.86	음성
5	No.8	-	1.395	0.91	음성	1.001	0.90	음성
6	No.11	-	1.594	1.04	음성	1.267	1.14	음성
7	No.19	-	0.967	0.63	음성	1.168	1.05	음성
8	No.20	-	1.355	0.89	음성	1.169	1.05	음성
9	골프	-	1.342	0.88	음성	1.169	1.05	음성
10	초코	-	1.291	0.84	음성	1.098	0.98	음성
11	수지	-	1.358	0.89	음성	1.175	1.05	음성
12	Df-19	-	0.979	0.64	음성	1.167	1.05	음성
13	Df-24	-	1.709	1.12	음성	0.951	0.85	음성
14	Df-25	-	1.682	1.10	음성	0.973	0.87	음성
15	Df-27	-	1.466	0.96	음성	0.989	0.89	음성
16	Df-28	-	1.403	0.92	음성	1.036	0.93	음성
17	Df-31	-	1.349	0.88	음성	1.134	1.02	음성
18	Df-38	-	1.626	1.06	음성	1.128	1.01	음성
19	Df-39	-	1.070	0.70	음성	1.134	1.02	음성
20	Df-41	-	1.299	0.85	음성	1.054	0.95	음성
21	Df-42	-	1.033	0.68	음성	1.129	1.01	음성
22	Df-48	-	0.920	0.60	음성	1.005	0.90	음성
23	Df-53	-	2.284	1.49	음성	1.298	1.16	음성
24	Df-54	-	1.787	1.17	음성	1.255	1.12	음성
25	Df-55	-	1.569	1.03	음성	1.172	1.05	음성
26	58따리	-	1.166	0.76	음성	1.201	1.08	음성
27	59	-	1.339	0.88	음성	1.069	0.96	음성
28	쿠돌	-	1.628	1.07	음성	1.020	0.91	음성
29	뽕피	-	1.752	1.15	음성	1.130	1.01	음성
30	Df-77	-	1.650	1.08	음성	1.017	0.91	음성
31	Df-81	-	1.467	0.96	음성	1.311	1.18	음성
32	Df-83	-	1.421	0.93	음성	1.266	1.14	음성
33	Df-84	-	1.406	0.92	음성	1.308	1.17	음성
34	Df-85	-	1.773	1.16	음성	1.115	1.00	음성
35	Df-88	-	1.299	0.85	음성	1.098	0.98	음성
36	Df-89	-	1.009	0.66	음성	1.186	1.06	음성
37	Df-90	-	1.635	1.07	음성	0.967	0.87	음성
38	Df-92	-	1.605	1.05	음성	1.120	1.00	음성
39	Df-93	-	1.803	1.18	음성	1.208	1.08	음성
40	Df-95	-	1.131	0.74	음성	1.186	1.06	음성
41	Df-96	-	1.360	0.89	음성	1.269	1.14	음성
42	Df-98	-	1.803	1.18	음성	1.234	1.11	음성
43	Df-101	-	1.773	1.16	음성	1.261	1.13	음성
44	Df-102	-	1.543	1.01	음성	1.021	0.92	음성
45	Df-103	-	1.482	0.97	음성	1.109	0.99	음성
46	Df-106	-	1.085	0.71	음성	1.158	1.04	음성
47	Df-107	-	1.559	1.02	음성	1.247	1.12	음성
48	Df-111	-	1.085	0.71	음성	1.172	1.05	음성
49	Df-112	-	1.284	0.84	음성	1.151	1.03	음성
50	Df-114	-	1.406	0.92	음성	1.158	1.04	음성

51	Df-116	-	1.345	0.88	음성	1.045	0.94	음성
52	Df-117	-	1.421	0.93	음성	0.980	0.88	음성
53	No.27	-	1.406	0.92	음성	1.225	1.10	음성
54	No.28	-	1.711	1.12	음성	0.806	0.72	음성
55	No.30	-	1.849	1.21	음성	1.219	1.09	음성
56	No.31	-	1.803	1.18	음성	1.183	1.06	음성
57	No.36	-	1.161	0.76	음성	0.785	0.70	음성
58	No.37	-	1.314	0.86	음성	1.168	1.05	음성
59	No.40	-	1.024	0.67	음성	1.169	1.05	음성
60	No.43	-	1.803	1.18	음성	1.169	1.05	음성
61	No.45	-	1.880	1.23	음성	1.098	0.98	음성
62	No.46	-	1.681	1.10	음성	1.175	1.05	음성
63	No.48	-	1.956	1.28	음성	1.167	1.05	음성
64	No.50	-	1.375	0.90	음성	0.951	0.85	음성
65	No.51	-	0.947	0.62	음성	1.255	1.12	음성
66	No.52	-	1.131	0.74	음성	1.172	1.05	음성
67	No.58	-	1.360	0.89	음성	1.201	1.08	음성
68	No.61	-	1.605	1.05	음성	1.069	0.96	음성
69	No.63	-	1.421	0.93	음성	1.020	0.91	음성
70	No.66	-	1.375	0.90	음성	0.785	0.70	음성

ㄹ 시제품은 동물병원에서 수집한 혈청 중 HI 시험에서 음성으로 판정된 개 검체에  
서 100% (n=70)의 특이도를 보이는 것으로 확인되었다.

㉠ 판정기준 (cut-off) 설정

ㄱ H3N2를 challenge한 후 10일 뒤에 채혈한 개 혈청 검체들과 동물병원 검체들 중  
HI Test에서 양/음성으로 판정된 검체들을 대상으로 판정기준(Cut-off)을 설정하  
였다.

ㄴ TG-ROC 분석을 이용한 판정기준 설정 (양성검체)

S/N	No. of Samples	Group		Sensitivity (%)
		P <sup>1)</sup>	N <sup>2)</sup>	
0.0	75	75	0	0.0
0.1	75	63	12	16.0
0.2	75	42	33	44.0
0.3	75	33	42	56.0
0.4	75	14	61	81.3
0.5	75	6	69	92.0
0.6	75	5	70	93.3
0.7	75	5	70	93.3
0.8	75	3	72	96.0
0.9	75	1	74	98.7
1.0	75	0	75	100.0

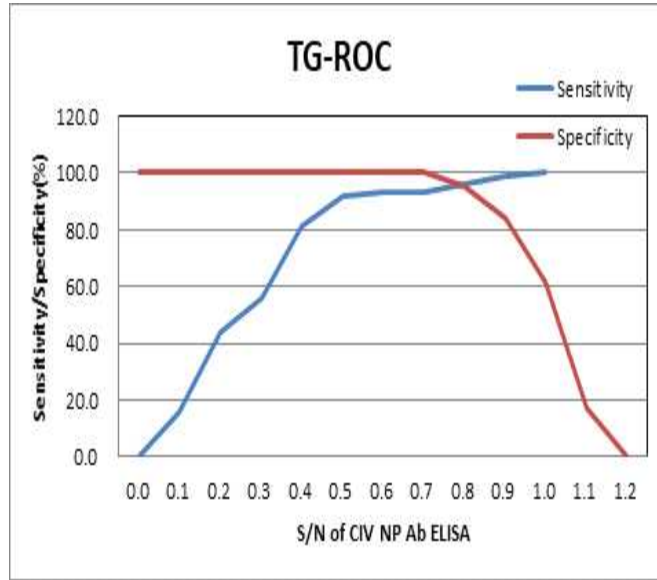
ㄷ TG-ROC 분석을 이용한 판정기준 설정 (음성검체)

S/N	No. of Samples	Group		Specificity (%)
		P	N	
0.0	70	70	0	100.0
0.1	70	70	0	100.0
0.2	70	70	0	100.0
0.3	70	70	0	100.0
0.4	70	70	0	100.0
0.5	70	70	0	100.0
0.6	70	70	0	100.0
0.7	70	70	0	100.0

1) 양성  
2) 음성



0.8	70	67	3	95.7
0.9	70	59	11	84.3
1.0	70	43	27	61.4



<TG-ROC 그래프>

ㄹ 시제품은 TG-ROC 분석결과, S/N값 0.60에서 민감도 93.3%, 특이도 100%를 나타내어 가장 적합한 판정 기준을 나타냈다.

㉔ 재현성 평가

ㄱ 시제품에서 양/음성으로 판정된 표준검체 (20종)을 사용하여 다른 검사자가 각각 다른 검사일에 다른 장소에서 2종의 시제품을 3회 검사하고 S/N값의 상관계수를 분석하여 재현성을 확인하였다.

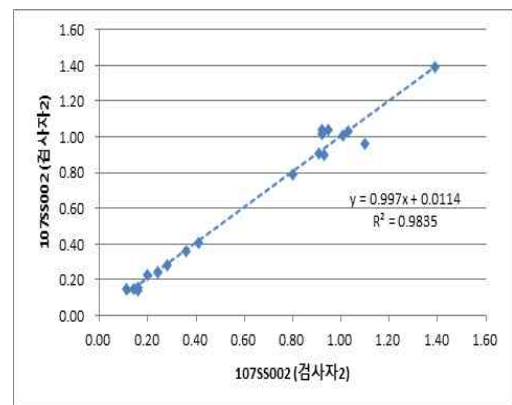
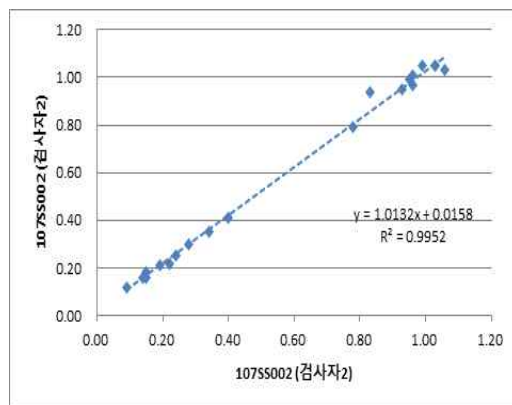
ㄴ 시제품의 검사 간 재현성 시험 결과

시료 번호	시료명	107SS002 (검사자 1)			107SS002 (검사자 2)		
		Mean OD	Mean S/N	결과	Mean OD	Mean S/N	결과
S01	No.2	0.168	0.14	P	0.173	0.16	P
S02	No.5	0.413	0.34	P	0.469	0.35	P
S03	No.7	0.270	0.22	P	0.271	0.22	P
S04	Df-15	0.187	0.15	P	0.198	0.16	P
S05	Df-20	0.298	0.24	P	0.313	0.25	P
S06	Df-56	0.350	0.28	P	0.400	0.30	P
S07	보리	0.238	0.19	P	0.292	0.21	P
S08	G4-10	0.111	0.09	P	0.181	0.12	P
S09	G5-16	0.180	0.15	P	0.210	0.18	P
S10	G5-17	0.490	0.40	P	0.492	0.41	P
S11	No.1	0.962	0.78	N	0.976	0.79	N
S12	No.3	1.311	1.06	N	1.286	1.03	N
S13	No.4	1.266	1.03	N	1.310	1.05	N
S14	크림	1.186	0.96	N	1.198	0.97	N
S15	수지	1.175	0.95	N	1.210	0.99	N
S16	포키	1.269	1.03	N	1.311	1.05	N
S17	건희	1.151	0.93	N	1.184	0.95	N
S18	쿠돌	1.020	0.83	N	1.151	0.94	N

S19	CHW MR-10	1.219	0.99	N	1.316	1.05	N
S20	CHW MR-11	1.183	0.96	N	1.238	1.01	N
	PC	0.270	0.22	P	0.299	0.24	P
	NC	1.174	1.00	N	1.218	1.00	N

시료 번호	시료명	107SS003 (검사자 1)			107SS003 (검사자 2)		
		Mean OD	Mean S/N	결과	Mean OD	Mean S/N	결과
S01	No.2	0.171	0.14	P	0.182	0.15	P
S02	No.5	0.443	0.36	P	0.434	0.36	P
S03	No.7	0.283	0.24	P	0.291	0.24	P
S04	Df-15	0.184	0.16	P	0.173	0.16	P
S05	Df-20	0.296	0.24	P	0.306	0.24	P
S06	Df-56	0.353	0.28	P	0.355	0.28	P
S07	보리	0.248	0.20	P	0.295	0.23	P
S08	G4-10	0.131	0.11	P	0.156	0.15	P
S09	G5-16	0.198	0.16	P	0.179	0.14	P
S10	G5-17	0.496	0.41	P	0.489	0.41	P
S11	No.1	0.979	0.80	N	0.943	0.79	N
S12	No.3	1.243	1.01	N	1.233	1.01	N
S13	No.4	1.269	1.03	N	1.279	1.03	N
S14	크림	1.171	0.95	N	1.281	1.04	N
S15	수지	1.145	0.92	N	1.253	1.02	N
S16	포키	1.339	1.39	N	1.310	1.39	N
S17	건희	1.132	0.93	N	1.083	0.90	N
S18	쿠놀	1.100	0.91	N	1.103	0.91	N
S19	CHW MR-10	1.227	1.10	N	1.187	0.96	N
S20	CHW MR-11	1.176	0.92	N	1.288	1.04	N
	PC	0.280	0.23	P	0.286	0.24	P
	NC	1.178	1.00	N	1.196	1.00	N

P: 양성, N: 음성

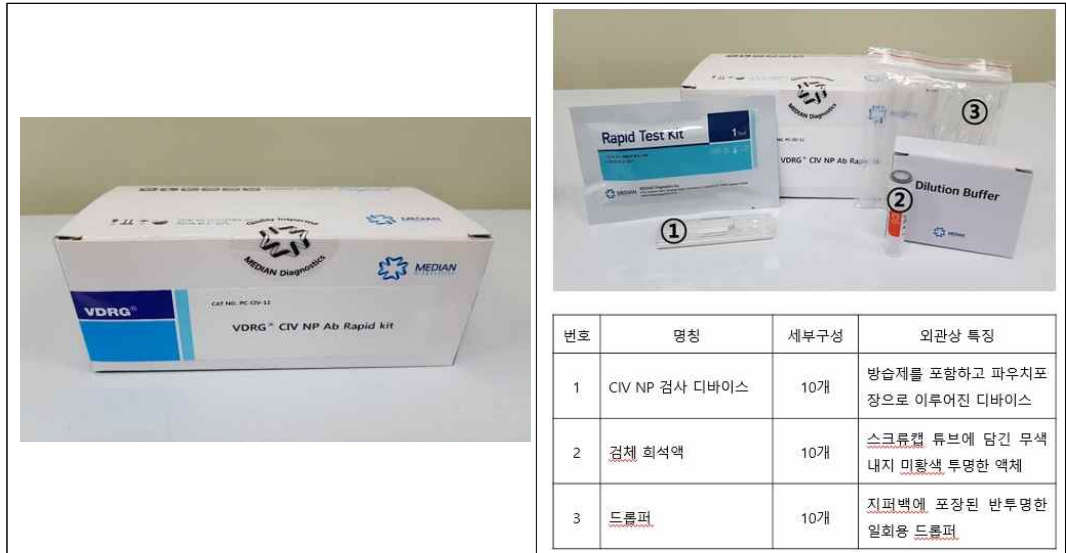


<검사 간 S/N값 상관성 분석결과>

ㄷ 표준물질을 사용하여 2개의 시제품을 검사한 결과, 검사 간 상관계수( $r^2$ )는 각각 0.99, 0.98로 높은 상관성을 보였으며, 판정 값에도 차이가 없어 시제품의 재현성이 우수한 것으로 확인되었다.

(라) 인플루엔자 total 항체 진단용 키트 [rec. NP(nucleoprotein)을 이용한 immunochromatographic assay]의 성능 평가

① 제품 사진



번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	CIV NP 검사 디바이스	10개	방습제를 포함하고 파우치포장으로 이루어진 디바이스
2	검체 희석액	10개	스크류캡 튜브에 담긴 무색 내지 미황색 투명한 액체
3	드롭퍼	10개	지퍼백에 포장된 반투명한 일회용 드롭퍼

② 제품설명서

③ 최저검출한계 (Limit of detection, LOD) 비교

- ㄱ HI Titer와 상용화 ELISA (IDEXX) 결과 양성으로 판정되고 HI Titer 기준 고, 중, 저역가 검체를 음성 혈청으로 2진 희석하여 상용화제품(IDEXX ELISA)과 검출 한계를 비교하였다
- ㄴ 상용화 제품의 경우 S/N값이 0.6 이하일 때 양성으로 판정하였다.
- ㄷ 시제품의 경우 gold reader (Medisensor社) 수치 400 이하 (400 초과 음성)를 양성으로 판정하였다.
- ㄹ 검체내역

No.	Name	HI Titer	IDEXX ELISA
-----	------	----------	-------------

1	G1-3	1280	0.11
2	G2-5	640	0.17
3	G5-14	320	0.12

ㄱ G1-3 LOD 결과

희석 배수	HI Titer	IDEXX ELISA		NP Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
2	640	0.03	+	0	+
4	320	0.04	+	0	+
8	160	0.08	+	0	+
16	80	0.10	+	34	+
32	40	0.15	+	37	+
64	20	0.22	+	251	+
128	10	0.34	+	485	-
256	-	N.T.	N.T.	688	-
512	-	N.T.	N.T.	902	-
1024	-	N.T.	N.T.	1151	-

희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	0	0	34	37	251	485	688	902	1151

ㄴ G2-5 LOD 결과

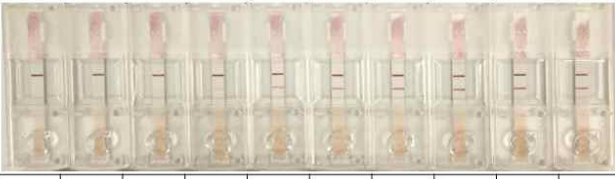
희석 배수	HI Titer	IDEXX ELISA		NP Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
2	320	0.26	+	0	+
4	160	0.27	+	0	+
8	80	0.37	+	181	+
16	40	0.48	+	301	+
32	20	0.66	-	649	-
64	10	0.86	-	737	-
128	-	1.03	-	875	-
256	-	N.T.	N.T.	973	-
512	-	N.T.	N.T.	1041	-
1024	-	N.T.	N.T.	976	-

희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	0	181	301	649	737	875	973	1041	976

ㄷ G5-14 LOD 결과

희석 배수	HI Titer	IDEXX ELISA		NP Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
2	160	0.30	+	0	+
4	80	0.38	+	0	+
8	40	0.46	+	0	+
16	20	0.59	-	173	+
32	10	0.67	-	522	-
64	5	0.77	-	780	-

128	-	0.87	-	952	-
256	-	N.T.	N.T.	1043	-
512	-	N.T.	N.T.	1187	-
1024	-	N.T.	N.T.	1046	-

희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	0	0	173	522	780	952	1043	1187	1046

○ 시제품은 HI 역가 20~40 정도까지 검출가능 하고 상용화 제품과 비교 시 검체에 따라 차이가 있지만 약 2배정도 차이를 보였다.


④ 분석적 특이도 평가

ㄱ HI Titer와 상용화 ELISA (IDEXX) 결과 음성으로 판정된 검체 5건을 이용하여 rapid kit의 특이도를 확인하였다.

ㄴ 시제품의 cut-off는 reader 수치 400 이하를 양성(400 초과 음성)으로 판정하였다.

ㄷ 분석적 특이도 결과

No.	Name	IDEXX ELISA		NP Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
1	Df-27	0.96	-	774	-
2	Df-28	0.92	-	892	-
3	Df-31	0.88	-	958	-
4	Df-38	1.06	-	1099	-
5	Df-39	0.70	-	775	-

검체	Df-27	Df-28	Df-31	Df-38	Df-39
ELISA	0.96	0.92	0.88	1.06	0.70
사진					
결과	774	892	958	1099	775

ㄹ 음성 표준검체 5건의 검체 모두 reader 수치상 400 이상으로 나타나 음성으로 판정되었다.

⑤ 교차반응성 평가

ㄱ CCV, CPV, CDV 혼합 백신을 접종한 개의 혈액을 이용하여 교차반응성 유무를 확인하였다.

ㄴ 시제품의 cut-off는 reader 수치 400 이하를 양성(400 초과 음성)으로 판정하였다.

ㄷ 교차반응 결과

No.	Name	IDEXX ELISA		NP Rapid kit	
		S/N	결과	Reader	결과
1	NC1	1.15	-	834	-
2	NC2	0.96	-	789	-
3	NC3	1.2	-	951	-

검체	NC1	NC2	NC3
ELISA	1.15	0.96	1.2
사진			
결과	834	789	951

ㄷ 3건의 검체 모두 음성 반응이 나타났다.

ㄹ CCV, CPV, CDV의 항체를 포함하고 있는 검체에서 음성으로 나타나 교차반응이 없는 것으로 확인 되었다.

⑥ 재현성 평가

ㄱ 양성 표준검체 중 G2-5(HI Titer 640) 검체를 이용하여 3회 반복 시험을 하여 재현성을 확인하였다.

ㄴ 시제품의 cut-off는 reader 수치 400 이하(400 초과 음성)를 양성으로 판정하였다.

희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	2	23	192	483	767	1004	1124	1090	1060
희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	0	0	173	522	780	952	1043	1187	1046
희석 배수	2	4	8	16	32	64	128	256	512	음성
사진										
결과	0	1	0	226	557	824	1038	1100	1207	1047

ㄷ 3회 모두 희석배수 16배까지 양성으로 검출하여 재현성 있음을 확인하였다.

⑦ 임상적 민감도 평가

ㄱ 상용화 ELISA (IDEXX) 결과 양성으로 판정된 검체 75건을 이용하여 시제품의 민감도를 확인하였다.

ㄴ 시제품의 cut-off는 reader 수치상 400 이하를 양성(400 초과 음성)으로 판정하였다.

ㄷ 임상적 민감도 결과

No.	Name	IDEXX ELISA	NP Rapid kit
1	G1-1	0.17	0
2	G2-4	0.09	0
3	G2-5	0.17	0
4	G3-7	0.35	0
5	G3-8	0.31	13
6	G3-9	0.10	0
7	G4-10	0.13	3
8	G4-11	2.03	91
9	G4-12	0.11	0
10	G5-13	0.18	23
11	G5-14	0.12	0
12	G5-15	0.09	0
13	G1-2	0.55	26
14	G1-3	0.11	7
15	G2-6	0.25	0
16	G6-16	0.27	4
17	G6-17	0.21	0
18	도도	0.29	3
19	No.5	0.48	112
20	No.7	0.28	106
21	No.9	0.43	2
22	No.10	0.24	130
23	No.14	0.58	919
24	No.17	0.41	190
25	No.21	0.34	134
26	둥지 1	0.11	13
27	둥지 2	0.12	4
28	꽁지	0.54	311
29	쥬디	0.11	0
30	사랑	0.12	0
31	Df-15	0.13	4
32	Df-20	0.17	181
33	보리	0.14	975
34	모리	0.26	206
35	Df-26	0.35	54
36	Df-32	0.36	75
37	Df-33	0.17	14
38	Df-35	0.16	13
39	Df-36	0.19	15
40	Df-37	0.31	0
41	Df-43	0.22	14
42	Df-44	0.53	375
43	Df-47	0.15	5
44	Df-49	0.14	0
45	Df-50	0.52	5
46	Df-51	0.13	0
47	Df-52	0.12	0
48	Df-56	0.10	0
49	Df-57	0.15	16
50	60	0.12	21
51	Df-58	0.19	0
52	Df-61	0.10	0
53	Df-62	0.13	8
54	Df-64	0.37	36
55	Df-65	0.12	0
56	Df-68	0.11	2

No.	Name	IDEXX ELISA	NP Rapid kit
57	Df-72	0.14	0
58	Df-76	0.14	63
59	Df-78	0.19	154
60	Df-79	0.15	0
61	No.22	0.29	23
62	No.25	0.14	9
63	No.26	0.13	0
64	No.35	0.11	0
65	No.38	0.30	94
66	No.44	0.19	13
67	No.53	0.18	0
68	No.54	0.53	424
69	No.57	0.34	102
70	No.59	0.24	21
71	No.60	0.26	18
72	No.62	0.45	64
73	No.65	0.37	6
74	No.67	0.12	0
75	No.68	0.13	0

ㄹ 75건의 검체 중 72건을 양성으로 판정하여 96%의 민감도를 보였다.

⑧ 임상적 특이도 평가

ㄱ 상용화 ELISA (IDEXX) 결과 음성으로 판정된 검체 70건을 이용하여 시제품의 특이도를 확인하였다.

ㄴ 시제품의 cut-off는 reader 수치상 400 이하를 양성(400 초과 음성)으로 판정하였다.

ㄷ 임상적 특이도 결과

No.	Name	IDEXX ELISA	NP Rapid kit
1	제시	1.13	803
2	오복이	1.22	839
3	두부	0.86	752
4	No.1	0.61	92
5	No.8	0.91	639
6	No.11	1.04	784
7	No.19	0.63	607
8	No.20	0.89	1120
9	골프	0.88	964
10	초코	0.84	808
11	수지	0.89	881
12	Df-19	0.64	94
13	Df-24	1.12	888
14	Df-25	1.10	1290
15	Df-27	0.96	774
16	Df-28	0.92	892
17	Df-31	0.88	958
18	Df-38	1.06	1099
19	Df-39	0.70	775
20	Df-41	0.85	409
21	Df-42	0.68	745
22	Df-48	0.60	1067
23	Df-53	1.49	848



No.	Name	IDEXX ELISA	NP Rapid kit
24	Df-54	1.17	902
25	Df-55	1.03	427
26	58띠리	0.76	632
27	59	0.88	799
28	쿠돌	1.07	1165
29	뽕미	1.15	842
30	Df-77	1.08	751
31	Df-81	0.96	826
32	Df-83	0.93	863
33	Df-84	0.92	864
34	Df-85	1.16	598
35	Df-88	0.85	734
36	Df-89	0.66	368
37	Df-90	1.07	1048
38	Df-92	1.05	902
39	Df-93	1.18	991
40	Df-95	0.74	831
41	Df-96	0.89	906
42	Df-98	1.18	974
43	Df-101	1.16	913
44	Df-102	1.01	724
45	Df-103	0.97	835
46	Df-106	0.71	896
47	Df-107	1.02	1028
48	Df-111	0.71	725
49	Df-112	0.84	683
50	Df-114	0.92	697
51	Df-116	0.88	411
52	Df-117	0.93	766
53	No.27	0.92	462
54	No.28	1.12	842
55	No.30	1.21	766
56	No.31	1.18	928
57	No.36	0.76	1019
58	No.37	0.86	483
59	No.40	0.67	714
60	No.43	1.18	831
61	No.45	1.23	906
62	No.46	1.10	974
63	No.48	1.28	913
64	No.50	0.90	907
65	No.51	0.62	148
66	No.52	0.74	850
67	No.58	0.89	1327
68	No.61	1.05	796
69	No.63	0.93	917
70	No.66	0.90	985

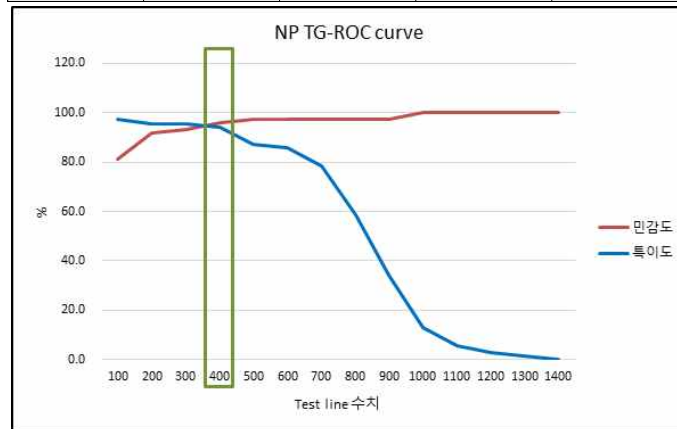
르 70건의 검체 중 66건을 음성으로 판정하여 94.3%의 특이도를 보였다.

⑨ 임상적 성능 요약

ㄱ 상용화 ELISA (IDEXX)로 양/음성이 확인된 검체 총 145건을 이용하여 시제품의 반응성을 확인한 결과 cut-off를 400으로 설정했을 때 민감도 96%(72/75건), 특이도 94.3%(66/70건)로 나타났다.

ㄴ 민감도, 특이도 결과

cut-off	양성(건)	음성(건)	민감도	특이도
100	61	2	81.3	97.1
200	8	1	92.0	95.7
300	1		93.3	95.7
400	2	1	96.0	94.3
500	1	5	97.3	87.1
600		1	97.3	85.7
700		5	97.3	78.6
800		14	97.3	58.6
900		17	97.3	34.3
1000	2	15	100	12.9
1100		5	100	5.7
1200		2	100	2.9
1300		1	100	1.4
1400		1	100	0.0
합계	75	70		



## 사. 개 인플루엔자 감시체계구축을 통한 신규 변이주 분리 및 바이러스 병원성 분석

(1) 개 인플루엔자 감시역학을 통한 양성 검체 확보 및 개발진단키트 검체적용평가

(가) 베트남 및 중국 협력기관과 감시역학을 통해 개에서 채취한 분변 샘플을 확보한 후 인플루엔자 양성 확인검체 선별을 위해 RNA 추출 후 Real time PCR 시행하여 양성 샘플 확인

① 샘플채취 및 바이러스 역가확인

㉠ 샘플준비

ㄱ 개의 분변 swab을 통해 92개의 샘플 채취

㉡ RNA 추출

ㄱ PerkinElmer chemagic 360 기기의 Viral DNA/RNA 프로토콜을 사용

㉢ Real time PCR 역가 측정을 위한 프라이머 정보

ㄱ SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step Kit를 사용하여 역가 측정함

ㄴ Roche LightCycler96 기기 사용함

② 시험방법

㉠ 바이러스 역가 측정

- ㄱ 분변 샘플에서 200ul 사용하여 RNA 추출
- ㄴ 시약 및 추출 방법은 PerkinElmer의 viral DNA/RNA 200ul 프로토콜 정보를 따름
- ㄷ 추출한 RNA를 이용해 인플루엔자 특이적 M gene에 대한 quantitative RT PCR을 수행하여 바이러스 역가를 측정함

Gene	Name	Sequences
M	Forward primer (5'-3')	GACCRATCCTGTACCTCTGAC
	Reverse primer (5'-3')	AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA
	5' Fluorophore	FAM
	Probe sequence (5'-3')	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG
	3'Quencher	BHQ-1

[realtime RT-PCR 인플루엔자 바이러스 M 유전자 특이적 Primer]

㉡ 분변 swab샘플 양성 검체 확보

Sample	Cq
No.1	35.27
No.2	<b>26.74</b>
No.3	34.07
No.5	<b>28.39</b>
No.6	35.69
No.8	<b>27.86</b>
No.9	33.4
No.10	<b>22.77</b>
No.15	34.77
No.17	36.1
No.18	<b>27.28</b>
No.79	37.25

바이러스 역가(숫자가 낮을수록 역가 높음)

㉢ 바이러스 배양

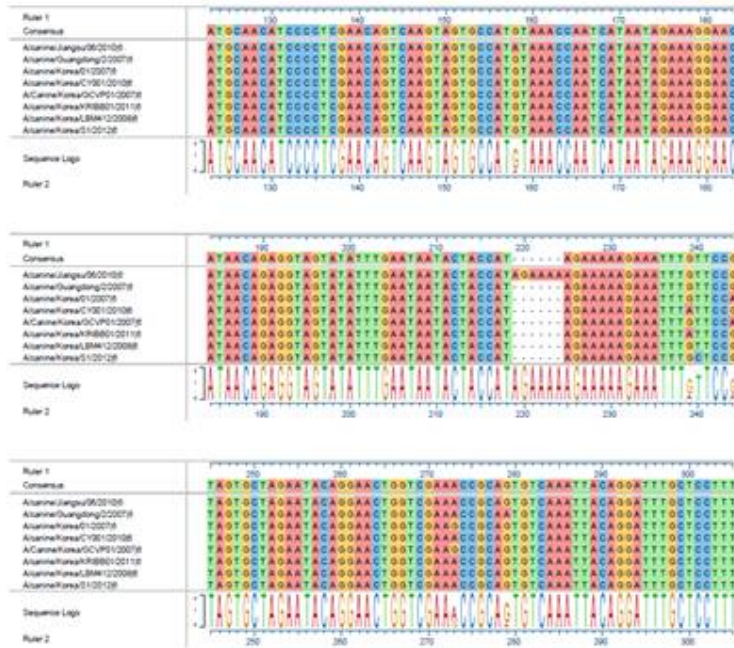
- ㄱ 바이러스를 100배 및 1000배 희석 후 11일차 유정란에 주사기를 통해 100ul 접종함
- ㄴ 접종 입구를 오염되지 않도록 막은 후 3일 동안 37℃ 부화기에서 배양함.
- ㄷ 3일 후 4℃에 24시간 유지함
- ㄹ 24시간 후 유정란 상층액을 추출하여 소분한 바이러스는 사용 전까지 -80℃ Deep freezer에 보관함

(나) 중국 협력기관과 감시역학을 통해 개에서 분리한 중국 변이 개 인플루엔자 바이러스 특성 분석

① 최근 중국에서 분리주에 대한 유전자 서열 분석

- ㉠ 중국 변이주를 확보하여 유전학적 정보 분석을 위해 alignment 는 Lasergene ver.12 Clustal omega 방법으로 수행하였다. 다양한 H3N2형 개 인플루엔자 바이러스

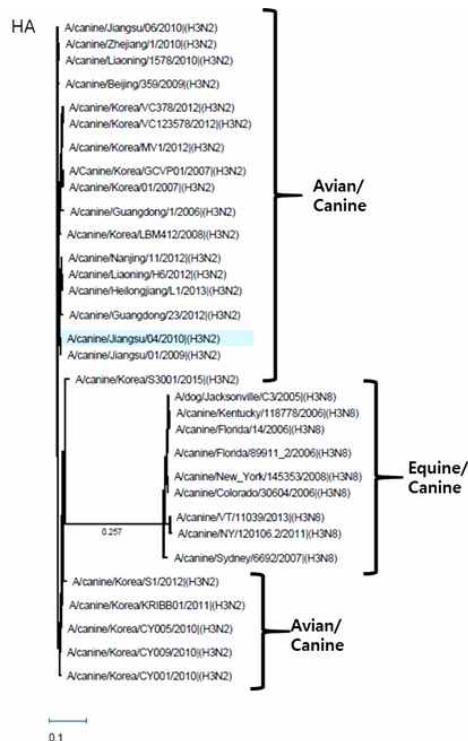
스와의 염기서열 비교분석 결과 Neuraminidase 시작코돈으로부터 219~224번 의 6 개 염기가 삽입되어있음을 확인하였다.



<Neuraminidase 유전자에서의 6개 nucleotide 삽입>

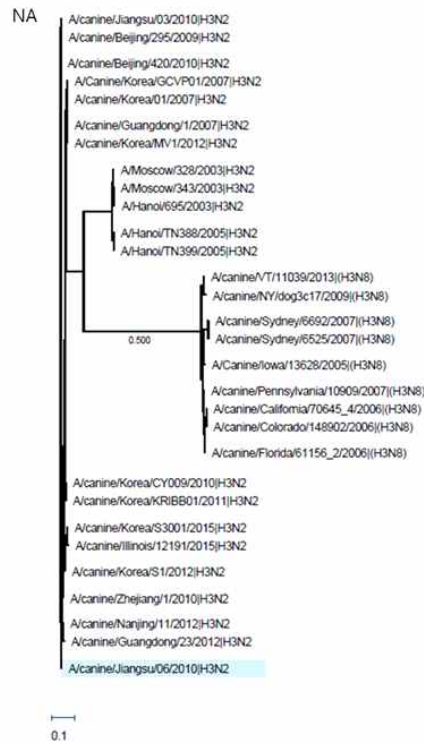
② 변이주 계통분석

㉞ 중국 변이주에 대한 계통 분석을 하기 위해 Lasergene ver.12 프로그램 Maximum likelihood method를 통해 유전자간 친밀도 및 국가간 바이러스 이동을 추정할 수 있는 계통도를 제작하였다.



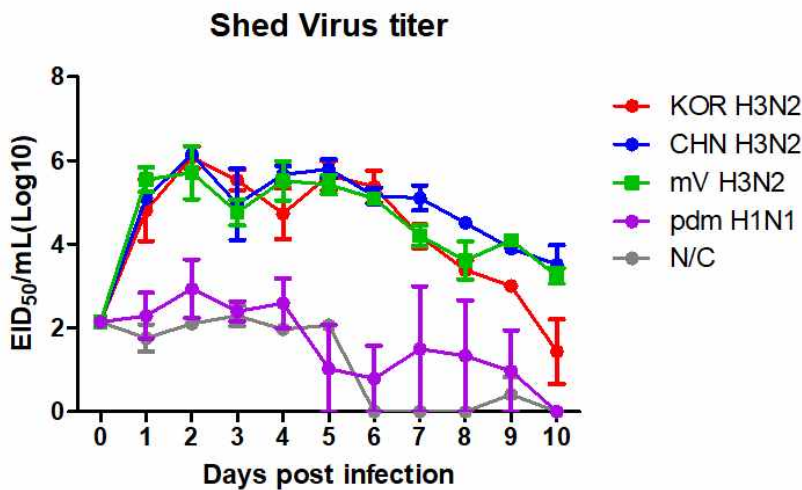
중국 변이주 개 인플루엔자 바이러스 HA 계통분석

- ㉔ 분석결과 중국 변이주의 HA, NA 유전자 모두 한국형과 같은 조류 유래 H3N2 개 인플루엔자 그룹에 속하고 있다.



중국 변이주 개 인플루엔자 바이러스 NA 계통분석

- ㉔ 중국형 개 인플루엔자 변이 분리주 병리학적 특성 비교
- ㉕ 비글 모델에서 중국형과 한국형 개 인플루엔자 바이러스를 비강을 통해서 감염시킨 후, 10일 동안 병원성을 조사하였다.
- ㉖ 공격접종 후 비루액을 채취하여 인플루엔자 바이러스 M gene 특이적 realtime RT-PCR을 이용하여 바이러스 유전자의 상대적 정량값과 이에따른 EID 역가 상관 관계를 바탕으로 비루액내 바이러스 역가를 측정하였음.

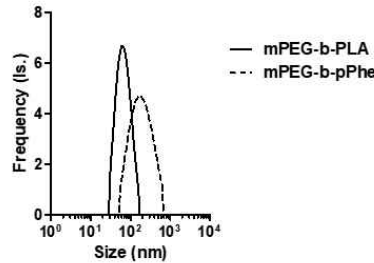


- ㉔ 그 결과, 중국형 개 인플루엔자 바이러스는 한국형과 유사한 바이러스 배출 역가를 나타내고 있으며, NA의 삽입된 아미노산의 유의미한 영향력은 관찰되지 않았음.

## 아. 개 인플루엔자 백신 아쥬번트 개량화

(1) 기존 백신 아쥬번트 개량화를 위한 2종 이상의 면역항원, 면역증강제 전달용 나노전달체 개발

(가) 1차년도에서 스크리닝한 생체 안정성 고분자 mPEG-b-PLA 와 mPEG-b-pPhe을 활용하여 나노 마이셀과 폴리머솜을 제조하여 2종의 나노전달체를 개발함.



(나) 두 나노입자가 모두 monodisperse 하게 제조되는 것을 확인했지만, mPEG-b-PLA 로 만든 나노전달체가 mPEG-b-pPhe 로 만든 입자에 비해 입자가 더 sharp 한 것을 확인함.

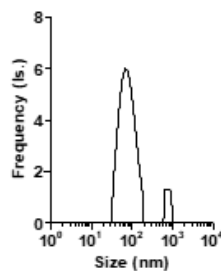
(다) mPEG-b-PLA를 면역항원, 면역증강제 전달용 나노전달체로 효과적일 것으로 판단하고 이를 다음 연구수행단계에서 계속 사용하였고 이를 PSome 이라고 표현함.

(라) Dynamic light scattering (DLS) 기기를 활용하여 측정한 mPEG-b-PLA로 제조한 나노전달체의 입자크기는 81.17±24.22 nm 임.

(2) 항원 및 면역 증강제 담지 효율 최적화 및 안정적 제어 기능 평가

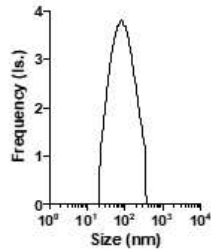
(가) 면역항원 모델로 OVA를 활용하여 개발된 나노전달체에 탑재하여 안정적인 담지를 확인함.

(나) 면역항원 모델 OVA를 (0.2mg/ml) stock 용액을 만들어 개발한 PSome 과 volume ratio 로 1:1 mix 하여 OVA@PSome을 제조하고 DLS 로 입자크기 및 안정성을 확인하였음.

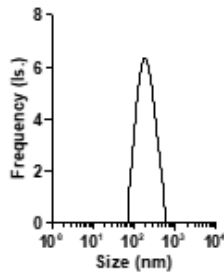


(다) OVA@PSome 의 입자크기는 111.41±27.1 nm 로 OVA가 탑재되기전 PSome 의 크기 에 비해 OVA 담지로 인한 입자크기의 증가를 확인함

(라) DLS 결과 데이터에서 담지되지 못하고 용매에 남은 OVA 가 확인되어 Dialysis method 로 워싱을 진행하여 잉여 OVA를 제거하였음.



(마) 추가로 면역증강제 스쿠알렌을 PSome 에 nanoprecipitation method를 활용하여 담지하고 DLS로 입자를 분석함. 입자의 크기는  $222.27 \pm 106$  nm 로 스쿠알렌 담지로 인해 입자의 크기가 증가한 것을 확인함.



(바) 항원(OVA)와 면역증강제(스쿠알렌)을 PSome 에 담지하고도 나노입자가 안정적으로 유지하며 제어되는 것을 확인함.

(3) 면역항원 또는 면역증강제가 탑재된 생체고분자 기반 나노전달체 아쥬번트의 거동 확인

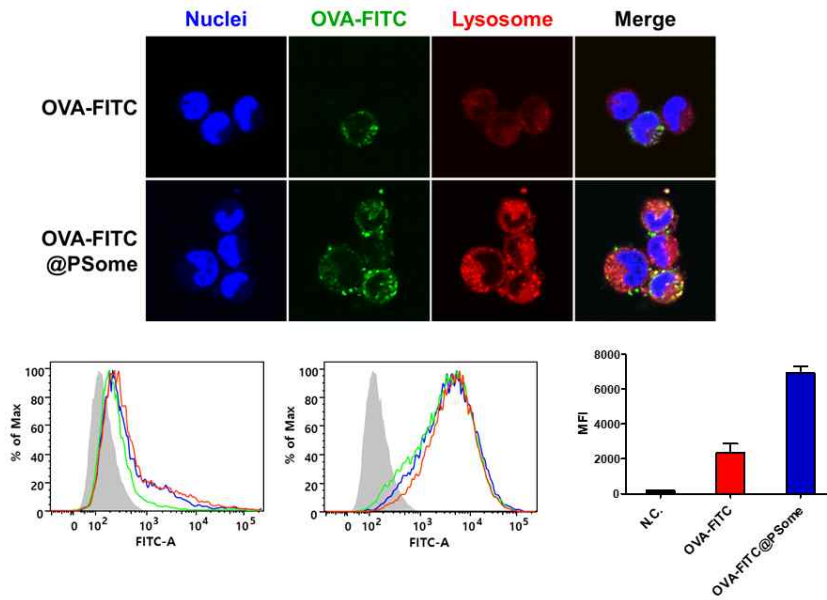
(가) 형광물질이 연결된 면역항원 (OVA-FITC)을 개발된 나노전달체에 탑재하여 대식세포(cell line : RAW264.7)에 처리하였을 때 항원전달 효율을 확인함.

(나) CLSM (confocal laser scanning microscopy) 을 활용하여 대식세포에 uptake 된 항원을 관찰하였음.

(다) OVA-FITC 단독 투여의 조건보다 OVA-FITC 가 PSome 에 탑재되어 투여된 조건에서 더 많은 양의 OVA-FITC가 uptake 된 것을 확인함. 그리고 LysoTracker red-99를 활용하여 lysosome 염색을 진행하여 OVA-FITC의 세포 uptake 후 세포내의 위치를 확인함. merge 되어 노란부분 외에 OVA-FITC(green)이 확인되는 것을 바탕으로 endosome escape을 통해 cytosol 에 항원이 전달된 것을 확인함.

(라) Flow cytometry를 활용하여 각 조건에서 OVA-FITC 의 세포 uptake 효율을 정량적으로 확인함.

(마) OVA-FITC 단독 투여 대비 OVA-FITC@PSome 의 경우에서 2.5배 이상 더 뛰어나 세포 uptake 효과가 나타나는 것을 확인함.

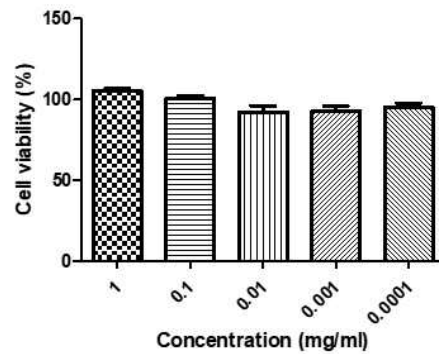


(4) 나노전달체 아주번트의 생체 안정성 검증

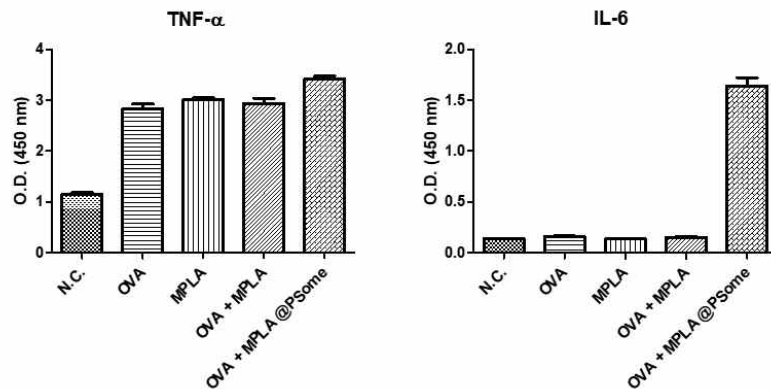
(가) 면역항원 및 면역보조제 탑재를 위해 활용되는 나노전달체의 생체안정성 분석을 진행함. Ez-cytox를 활용하여 나노전달체 고분자의 세포독성실험을 진행함.

(나) 고분자의 농도를 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mg/ml 로 조절하여 RAW264.7 (a murin macrophage cell line)에 처리하고 24hr 인큐베이션 하였음.

(다) 모든 조건에서 세포 생존율이 90% 이상을 확인하였고, 나노 독성이 없음을 확인하였고 생체안정성을 검증하였음.

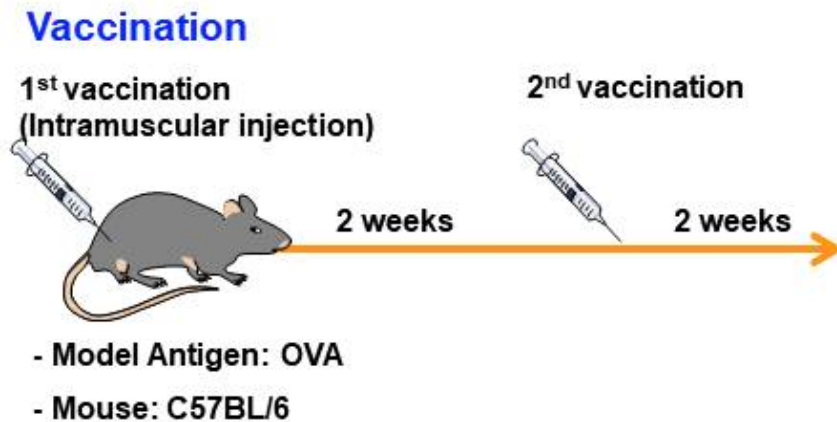


(5) 면역항원 및 면역보조제가 탑재된 나노전달체 아주번트의 면역활성능 평가

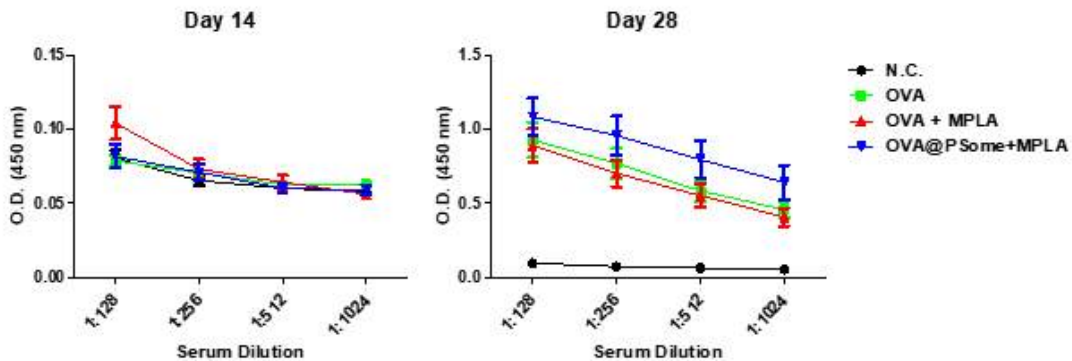




- (가) murin macrophage cell line 으로 RAW264.7을 선정하였음. 면역항원 모델로 OVA, 면역보조제 모델로 MPLA를 선정하였음. 5가지 조건 N.C. (non treat, 음성조건), OVA 단독, MPLA 단독, OVA+MPLA, OVA+MPLA@PSome (OVA과 MPLA가 동시 탑재된 나노 전달체)을 선정하여 세포에 처리후 12 hr 인큐베이션 하였을 때, 발생하는 cytokine을 분석하고자 함.
- (나) 세포를 가라 앉히고 상층액에서 세포가 분비한 cytokine을 ELISA 로 분석함. Th1 기반 면역반응과 관련된 cytokine (TNF-alpha, IL-6)를 선정하였음.
- (다) OVA 단독, MPLA 단독, OVA+MPLA 조건에서는 TNF-alpha 와 IL-6 분비가 음성조건과 대비해서는 더 높게 나왔지만 각 조건과의 차이는 미비하였음.
- (라) OVA+MPLA@PSome 의 조건에서는 모든 다른 조건보다 더 높은 cytokine 분비를 확인하였음. TNF-alpha와 IL-6 두가지 분석에서 모두 높은 분비를 확인하였음.
- (마) 이를 바탕으로 나노전달체를 활용한 면역항원 및 면역보조제 동시전달의 경우에서 가장 높은 세포 활성화, 면역세포 자극능이 뛰어난 것을 확인하였음.



- (바) In vivo에서 면역활성능을 분석하기 위해 마우스를 동물모델로 (C57BL/6) 선정하였음. 2주 간격으로 2차례 백신접종을 진행하였음.
- (사) N.C. (non-treat, 음성조건), OVA 단독, OVA+MPLA, OVA+MPLA@PSome 로 4가지 그룹을 선정하였음.



- (아) 1차접종 2주후 (day14)와 2차접종 2주후 (day28) 에 채혈을 진행하여 혈장에서 항원 (OVA) 특이적 항체 생성능을 분석하였음.
- (자) day14 에서는 모든 그룹에서 항체생성능이 저조한 것을 확인하였고, day28 에서는 그

립별 항체 생성능이 day14에 비해서 월등히 증가한 것을 확인하였음. 또한, day 28에서 OVA+MPLA@PSome 의 조건에서 가장 뛰어난 항체생성능을 보이는 것을 확인하였음

- (차) 이를 바탕으로 두차례 접종을 통해서 백신 효능 부스팅 효과를 확인할 수 있었고, 면역항원(OVA)와 면역보조제(MPLA)가 동시 탑재된 나노전달체(PSome) 그룹에서 가장 뛰어난 항체생성능, 면역활성능이 나타난 것을 확인할 수 있었음.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 가. 목표

- (1) 개 인플루엔자 DIVA 진단시스템 개발을 위한 재조합단백질 및 단클론항체 제작 및 원료 물질을 이용한 ELISA/immunochromatographic assay(ICA, rapid kit) 의 반응성 평가
- (2) 개 인플루엔자 감시역학을 통한 양성 검체 확보 및 개발진단키트 검체적용평가
- (3) 유니버설 개 인플루엔자 백신용 항원 생산을 위한 정제시스템 최적화
- (4) 목적 동물을 이용한 백신 효능 및 유효성 평가
- (5) A형 인플루엔자 바이러스에 대한 역유전학(reverse genetics) 시스템 구축 및 백신 플랫폼 확립
- (6) 개 인플루엔자 백신 아주먼트 개량화

#### 나. 목표 달성여부

범용 백신 후보물질 생산 최적화	- 고순도 백신용 항원생산을 위해 His-tag affinity와 친화크로마토그래피법과 gel filtration chromatography법을 Akta Prime purification system을 이용하여 순도가 높은 단백질 정제시스템을 최적화하여 목표 대비 100% 목표를 달성되었음.
범용백신 후보물질의 유효성 검증	- 고순도 정제된 범용백신 후보물질을 소동물 모델을 이용하여 백신 후보물질의 항원특이적 및 교차면역능을 검증하였음. 목표대비 100% 달성되었음.
실험동물을 이용한 백신 효능 평가	- 기니피그 동물모델에서 3종 시험백신(범용항원, 범용항원+CIV, 상용백신)의 접종 후 ELISA 항체가 확인. 성과목표대비 100% 달성되었음. - 3종 시험백신을 목적동물(비글견)에 접종 후 homologous virus (H3N2)와 heterologous virus (H1N1)를 각각 공격접종하여 백신 효능 검증하였음. 따라서, 성과목표대비 100% 달성되었음
개 인플루엔자 감시역학을 통한 양성 검체 확보	- 베트남 및 중국 협력기관과 감시역학을 통해 개에서 채취한 분변 샘플을 확보한 후 인플루엔자 양성 샘플 확인 및 라이브러리 구축
개 인플루엔자 백신 아주먼트 개량화	- 2종의 나노전달체 제조 및 최적의 면역항원, 면역증강제 탑재 나노전달체 선정 - DLS (Dynamic light scattering) 기기를 활용하여 PSome 의 나노입자 크기 분석 및 면역항원, 면역증강제 담지후의 크기를 분석완료 - 개발된 폴리머솜 나노전달체를 활용한 대식세포에 면역항원 전달 확인
A형 인플루엔자 바이러스에 대한 역유전학 시스템 구축	- A형 인플루엔자 바이러스 표준주인 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스를 이용하여 역유전학 시스템을 구축함
역유전학 시스템 기반 개 인플루엔자 재조합 백신 개발 플랫폼 확립	- 역유전학 시스템을 기반으로 A/PR/8/34 (H1N1) 바이러스를 backbone으로 하고 개 인플루엔자 바이러스의 HA 또는 NA를 재조합한 신규 개 인플루엔자 재조합 백신주를 확립함(CIV HA+PR8, CIV NA+PR8 및 CIV HA/NA+PR8) - 신규 개 인플루엔자 재조합 백신주에 대한 생물학적 및 유전학적 특성 분석을 완료함
신규 개 인플루엔자 재조합 백신 개발	- 역유전학 시스템 기반 개 인플루엔자 재조합 백신주를 이용하여 신규 개 인플루엔자 재조합 불활화 백신을 개발함

	- 신규 개 인플루엔자 재조합 불활화 백신에 대한 유효성 및 안정성 평가를 완료함
개 인플루엔자 DIVA 진단키트 제품화 및 성능평가 및 인허가 서류 자료 작성	- 개 인플루엔자 백신 항체 및 감염 항체 구분용 진단키트 제품화 및 성능평가 완료 : 백신측과 감염측 항체를 구분하는 항체진단을 통해 개 인플루엔자 감염 여부를 판단 : NS1 단백질을 이용한 항체측정용 ELISA 및 신속진단 감별키트의 개발 : 감염 항체 진단 ELISA 키트 [민감도 100%(n=20), 특이도 92.9%(n=70)], Rapid 키트 [민감도 90%(n=20), 특이도 92.9%(n=70)], total 항체 진단 ELISA 키트 [민감도 93.3%(n=75), 특이도 100%(n=70)], Rapid 키트 [민감도 96%(n=75), 특이도 94.3%(n=70)]의 개발

**다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)**

## 4. 연구결과와 활용 계획 등

- (1) 개 인플루엔자 백신축과 감염축 감별 진단용 진단키트 상용화하여 개 인플루엔자 field 감염실태조사 시 이용.
- (2) 개 인플루엔자 감별 진단시스템 확립을 통한 효율적인 vaccination program 설정
- (3) 개 인플루엔자 유행을 최소화하기 위한 방역체계 수립 시 기본적 활용 solution 제공
- (4) 범용 개 인플루엔자 백신 개발을 위한 항원 개발을 통한 원천 기술 확보
- (5) 범용 개 인플루엔자 백신 시제품 제작 및 상용화 추진
- (6) 새로운 범용 백신기술 발굴에 핵심정보를 제공하여 국내 기업 개발 역량의 극대화에 기대

붙임. 참고문헌

### 주 의

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