

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

가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004110-01

닭 마이코플라즈마병(MG, MS) 예방접종축과 자연감염축 감별 프로토콜 개발

2022. 07. 06.

주관연구개발기관 / 건국대학교 산학협력단
공동연구개발기관 / (주) 코젠바이오텍
공동연구개발기관 / 전북대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "닭 마이코플라스마병(MG, MS) 예방접종축과 자연감염축 감별 프로토콜 개발"(개발기간 : 2020. 04. 29. ~ 2021. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다

주관연구기관명 : 전국대학교 산학협력단
공동연구기관명 : (주) 코센바이오텍
공동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단



주관연구책임자 : 이 상 원
공동연구책임자 : 김 정 현
공동연구책임자 : 강 민

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

< 요약 문 >

사업명		가축질병대응기술개발		총괄연구개발 식별번호		
내역사업명				연구개발과제번호		320061-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	60 %	LB0704	40 %	%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	10 0%		%	%
총괄연구개발명						
연구개발과제명						
전체 연구개발기간						
2020.04.29 ~ 2021.12.31						
총 연구개발비						
총 706,700 천원 (정부지원연구개발비: 530,000 천원, 기관부담연구개발비 : 176,700 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도		착수시점 기준() 종료시점 목표()
연구개발과제 유형						
연구개발과제 특성						
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		닭 마이코플라즈마병 예방접종축과 자연감염축 감별 프로토콜 개발			
	전체 내용		<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS)의 야외분리주 획득 2. 국내 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS)의 야외 분리주의 전장유전체 확보 3. 전장유전체 비교 분석을 통한 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS) 야외 분리주, 국내 시판 백신주 감별 진단 마커 및 PCR 분석법 개발 4. 감별 진단법 평가 			
연구개발성과	<p>국내 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS)의 야외 분리주 획득</p> <ul style="list-style-type: none"> - 백신 유래주가 아닌 마이코플라즈마 시노비에(MS) 야외분리주 9주 확보 - 백신 유래주가 아닌 마이코플라즈마 갈리셉티쿰(MG) 야외분리주 2주 확보 <p>국내 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS)의 야외 분리주의 전장유전체 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 마이코플라즈마 시노비에(MS) 전장유전체 5주 확보 - 마이코플라즈마 갈리셉티쿰(MG) 전장유전체 2주 확보 <p>전장유전체 비교 분석을 통한 닭 마이코플라즈마병 병원체(MG, MS) 야외 분리주 국내 시판 백신주 감별 진단 마커 및 PCR 분석법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - MS와 MG 국내 야외분리주와 백신주 감별 특이 SNP 발굴 - 발굴된 진단 마커를 적용하여 conventional PCR, real-time PCR 분석법 개발 <p>감별 진단법 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 민감도, 특이도, 정밀도 및 농장 시료를 이용한 효능평가 					
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> - MS와 MG 야외 분리주 및 전장유전체를 차후 연구에 활용 - 개발된 닭 마이코플라즈마병 감별진단법의 특허등록 및 제품화 실시를 통한 국내 닭 마이코플라즈마병 예방 및 방역 - MS, MG 스크리닝 매뉴얼 확립을 통한 진단 신속화 및 효율화 					
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음					

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	0	2		0							
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	마이코플라즈마 시노비에		마이코플라즈마 갈리셉티쿰		실시간 중합효소 연쇄반응		중합효소 연쇄반응		감별진단			
영문핵심어 (5개 이내)	Mycoplasma synoviae		Mycoplasma gallisepticum		Real-time PCR		Conventional PCR		Differential diagnosis			

최종보고서				보안등급		
				일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]		
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	가축질병대응기술 개발사업	
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
				연구개발과제번호	320061-2	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	60 %	LB0704	40 %	
	농림식품과학기술분류	RB0201	10 0%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문					
	영문					
연구개발과제명	국문	닭 마이코플라즈마병(MG, MS) 예방접종축과 자연감염축 감별 프로토콜 개발				
	영문	Development of protocols for differentiation of field strain and vaccine strain of avian mycoplasmosis				
주관연구개발기관	기관명	건국대학교 산학협력단	사업자등록번호	206-82-07325		
	주소	(우:02029)서울시 광진구 능동로 120 건국대학교	법인등록번호	240171-0007625		
연구책임자	성명	이상원	직위	교수		
	연락처	직장전화		휴대전화		
		전자우편		국가연구자번호		
연구개발기간	전체	2020. 04. 29 - 2021. 12. 31 (21 개월)				
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2020. 04. 29 - 2021. 12. 31 (21 개월)			
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()		합계	
	현금	현금	현물	현금	현물	
총계	530,000	176,700			530,000 176,700 706,700	
1단계	1년차	230,000	76,700			230,000 76,700 306,700
	2년차	300,000	100,000			300,000 100,000 400,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	
공동연구개발기관	(주) 코젠바이오텍	김정현	연구소장			
	전북대학교	강민	조교수			
위탁연구개발기관	(주) 체리부로	임태현	이사			
연구개발담당자 실무담당자	성명	송용준		직위	석사	
	연락처	직장전화		휴대전화		
		전자우편		국가연구자번호		

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

2022년 07월 06일

연구책임자: 이 상 원

주관연구개발기관의 장: 건국대학교 산학협력단장 송용준 (직인)
 공동연구개발기관의 장: (주)코젠바이오텍 (직인)
 공동연구개발기관의 장: 전북대학교 산학협력단장 강민 (직인)
 위탁연구개발기관의 장: (주)체리부로 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	19
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	50
4. 목표 미달 시 원인분석	58
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도	59
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	59

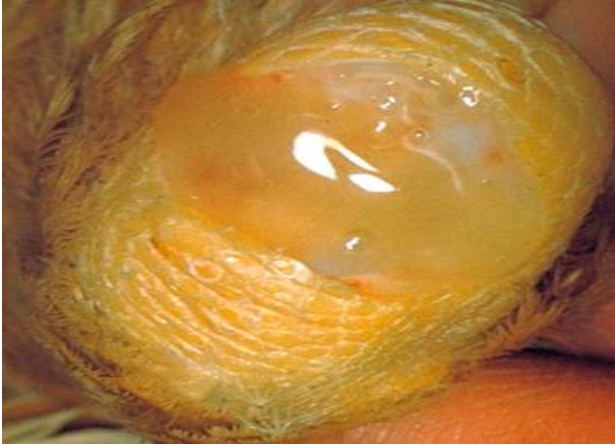
별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

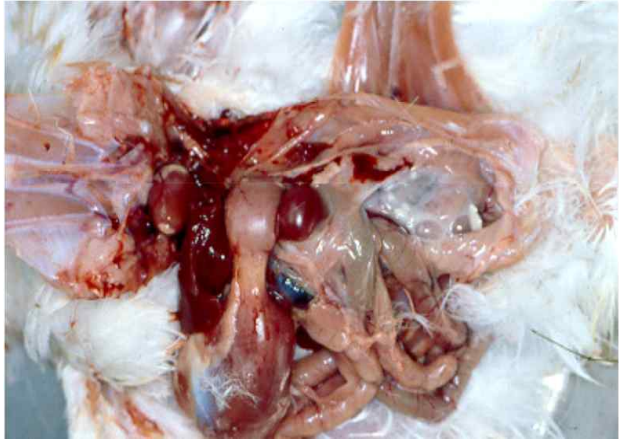
1-1. 연구개발과제의 필요성

- 마이코플라즈마 (Mycoplasma)는 세포벽이 없는 그람 양성의 세균으로 스스로 증식할 수 있는 세균 중 크기와 유전자 사이즈가 가장 작으며 일반적인 세균이 통과하지 못하는 0.45um 필터를 통과할 수 있음.
- 마이코플라즈마는 작은 유전자 사이즈 때문에 숙주 특이성이 높으며, 생장에 필요한 주요 영양분을 생합성 하지 못해 인공배양이 어려움.
- 마이코플라즈마 갈리셉티쿰(Mycoplasma gallisepticum, MG)와 마이코플라즈마 시노비에 (Mycoplasma synoviae, MS)는 닭에서 만성 호흡기성 질환을 유발하는 주요 병인체임.
- MG 감염은 기관염, 비강 삼출물, 기관등의 임상증상을 나타내며, 사료 섭취율과 체중 감소가 나타나며 전염성 기관지염, 뉴캐슬병, 조류독감과 대장균 등 호흡기 증상을 유발하는 바이러스, 세균 병인체와 복합감염 시, 심각한 임상증상을 나타내며 높은 이환율과 폐사율을 보임.
- MG의 전파는 직접, 간접 전파 모두 발생하며 증상이 없이도 감염이 이루어지기 때문에 발생 시 계군 내 전파율이 높음. 또한 감염은 계군 밀도가 높을수록 빠르게 이루어지기 때문에 밀집 사육 시 주의가 필요함. 이와 함께 수직전파가 가능하여 감염된 종계에서 생산된 후대 병아리는 MG에 감염되어 태어남.
- MS 감염은 보통 준임상적인 형태로 나타나지만 감염주의 병원성에 따라 때때로 MS 단독으로 전신성 감염이 진행될 수 있으며, 그 결과 Exudative synovitis, tenovaginitis, bursitis를 동반하는 전염성 관절염을 유발할 수 있음.
- 닭 전염성기관지염과 같은 다른 호흡기 병원체와 동시에 감염되거나 바이러스성 호흡기 질환을 막기 위한 생독 백신이 투여된 후 MS가 감염되면 기낭염과 같은 심각한 임상증상을 초래할 수 있음.

(A)



(B)



<그림 1> MS로 인한 임상증상

(A) 전염성 관절염 (B) MS+IB 복합감염으로 인한 기낭염

- 호흡기 유래 E.coli와 MS가 혼합 감염될 경우 산란율이 가장 높은 일령의 산란계에서 복막염을 유발해 닭의 치사율을 증가시키고 산란률을 떨어트리며, MS가 난관에 감염하여 Egg shell apex abnormality (EAA)를 유발하여 계란의 상품성 및 부화율을 감소시킴.

(A)



(B)



<그림 2> MS로 인한 임상증상

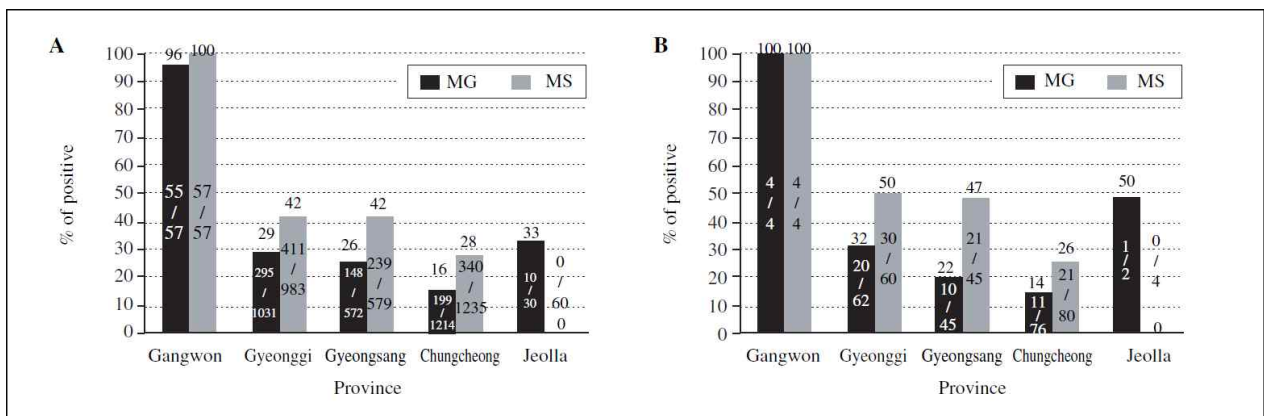
(A) E.coli Peritonitis syndrome (B) EAA

- 관절형 MS균에 감염된 산란계들은 성장률 감소와 함께 다리이상 닭들을 골라내야 하는 부담으로 인한 경제적 손실이 발생할 수 있음.

<2013년도 포르투갈에서 발생한 산란계 MS감염으로 인한 생산률 저하(Moreira et al, 2013)>

Egg production	-9,02%
Hatchability	-3,94%
Chicks production	-15,3%
Total mortality	15,3%

- 전파는 주로 난계대를 통한 수직전파이며 호흡기계를 통한 수평전파 또한 가능하며 이환율은 보통 90-100% 정도로 매우 높은 편이며, 폐사율은 보통 1% 미만이지만 감염주의 병원성에 따라 10% 까지 오를 수 있음.
- 국내에서 2007년부터 8월부터 2009년 6월까지 전국적으로 백신접종 경력이 없는 산란계와 육계 농장을 대상으로 채혈을 실시한 후 ELISA와 SPA를 통해 MG, MS 항체 양성을 확인한 결과 전국적으로 MG는 24%, MS는 39%의 농장이 양성으로 조사되었으며 전국적으로 다량의 백신을 사용하고 있는 MG보다 항체 양성율이 높음을 보여 국내 MS의 감염율이 매우 높은 것으로 판단되었음 (Jang et al, 2010, Korean Vet Serv).



<국내 지역별로 MS 항체 양성율>

A: 계군별 B:농장별

- 2010년 농림수산식품부 국립수의과학검역원의 발표결과에 따르면 국내 원종계 농가의 항체 검사 결과 MG는 71.1%(32/45), MS는 86%(39/45)의 항체양성률을 보였다. 종계 농가의 경우 MG는 88.7%(903/1018), MS는 77.0%(784/1018)의 항체양성률을 나타내 마이코플라즈마 감염이 심각한 수준으로 판단되었음

<원종계 항체양성률>

Table 4. Prevalence of avian mycoplasmosis in the grand parent flocks in 2009

Mycoplasma species	Viral gene detection (%)	Sero-conversion (%)
MG	0/45 (0.0) [*]	32 [‡] /45 (71.1)
MS	2/45 (4.4)	39/45 (86.0)

MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*.

^{*}No. of positive flocks/No. of tested flocks (%).

[‡]4 flocks were vaccinated with inactivated MG bacterin.

<종계 항체양성률>

Table 5. Prevalence of avian mycoplasmosis in the parent flocks in 2009

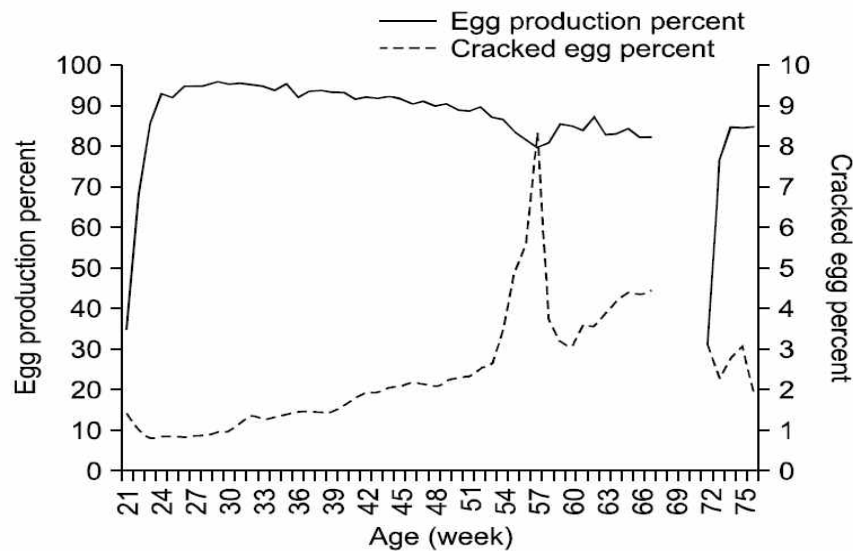
Mycoplasma species	Viral gene detection (%)	Sero-conversion (%)
MG	29/999 (2.9) [*]	903 [‡] /1,018 (88.7)
MS	117/999 (11.7)	784/1,018 (77.0)

MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*.

^{*}No. of positive flocks/No. of tested flocks (%).

[‡]150 flocks were vaccinated with inactivated MG bacterin.

- 국내 2014년도 산란계에서 MS 항체 양성율을 검사한 결과 88.6%의 계군이 양성으로 조사되었고 (Cho et al, 2014, JPSA), 2016년도 전북지역 육용종계에서 MS 항체양성율을 검사한 결과 총 33농가 중 2개의 농장을 제외한 94%의 농가가 양성으로 조사되었으며, 95계군 중 84.2%의 계군에서 항체를 갖고 있는 것으로 나타남 (Kwak et al, 2016, Korean Vet Serv).
- 국내에서 진행된 한 연구에 따르면 경기도의 한 산란계 농장에서 55주령 산란계에서 난각의 이상을 보여 검사를 한 결과, 원인은 MS 감염으로 인한 EAA 였으며 그로인해 54주령부터 산란계의 산란능력(Egg production)이 3주동안 86%에서 79%로 감소하였으며 깨진 계란의 비율이 2.6%에서 8.3%로 증가하였음 (Jeon et al, 2014 Journal of Veterinary Science).



<국내 산란계 농장에서 MS 감염으로 발생된 EAA로 인한 Egg production의 감소, Jeon et al, 2014, Journal of Veterinary Science>

- 현재까지 국내에서 MS 백신을 실시하지 않았기 때문에 국내 양계농장의 높은 MS 항체 양성율은 모두 MS 야외주 감염으로 인한 것이며, 2016년도 연구에 따르면 MS 항체가 양성인 계군에서 모두 MS 유전자가 검출되었으며 이는 지속적인 수평감염이 이루어지고 있음을 나타냄 (Kwak et al, 2016, Korean Vet Serv).

- 수평전파와 수직전파를 통한 높은 전염성으로 인해 국내에 만연되어 있는 MG, MS 감염은 육계와 산란계에서 눈에 보이지 않는 큰 경제적 피해를 일으키며 이를 근절시키기 위해서는 방역조치와 분리균주의 병원성 조사가 체계적으로 필요함.
- 국내에서 MG 감염을 막기위해 사용하는 생독백신은 ts-11, 6/85, F strain 3종류 이며, MS 감염을 막기 위해 사용하는 생독백신은 MS-H 1종류임.
- 하지만 높은 항체 양성율에도 불구하고 현재 주로 이용되는 방제프로그램은 정기적인 혈청검사를 통하여 계군의 감염유무를 검색하고 또한 육성기 동안 적절한 투약을 병행하는 형태임.
- 감염된 계군내 MG, MS 감염을 근절시키기 위해서는 많은 양의 항생제가 투여되어야 하며, Mycoplasma가 비교적 빠르게 특정 항생제에 내성을 획득하기 때문에 항생제 감수성 테스트를 통해 감수성 있는 항생제를 적절한 농도로 투여해야 함. 하지만 야외주의 순수분리에 많은 시간이 소요되고 진단이 가능한 기관이 많지 않아 항생제 감수성 검사가 현실적으로 이루어지지 못하고 있음.
- 기존에 MG, MS 국내 분리주에 대한 항생제 최소성장억제 농도에 대한 정보가 없었기 때문에 항생제를 이용하여 MG, MS 감염을 근절시키기 위해서는 많은 종류의 항생제를 다량으로 투여했으며 이는 항생제 내성균의 출현과 항생제 잔류에 대한 사회적, 경제적 문제가 됨.
- 한 예로 국내 Multi-age 육용종계 농장에서 발생된 MS 감염을 근절시키기 위해 이 농장에서 사용된 6개의 항생제 투여에 대한 총 금액은 64,553 USD으로 한 마리당 1.321 USD 이며 이는 백신 사용 비용보다 매우 높음 (Hong et al, 2015, Poultry Science).

<MS감염을 근절시키기 위해 사용된 항생제와 기간>

Antibiotics ^a	Duration (days)	Number of birds per treatment	Antibiotics amount	Total Cost (USD)	Cost/bird (USD)
Til	24	47,500	37 L	27,360	0.576
CTC	17	40,000	1,000 kg	4,250	0.106
Enro	16	55,000	528 L	10,560	0.192
Doxy	16	50,000	960 L	22,080	0.441
Amo	3	60,000	13.5 kg	243	0.004
Gent	1	40,000	500 ml	60	0.002
Total	77	292,500		64,553	1.321

^aTil, Tilmicosin; CTC, Chlortetracycline; Doxy, Doxycycline; Enro, Enrofloxacin; Amo, Amoxicillin; Gent, Gentamicin.

- 때문에 백신을 사용하여 MG, MS의 감염율을 낮추는 전략이 경제성이 뛰어나며 또한 농림축산식품부 고시인 종계장 부화장 방역관리요령 제4조(예방접종 등의 금지)에 해당하지 않는 MG, MS는 백신이 가능함. 따라서 백신을 이용하여 MG, MS의 감염을 예방하는 것이 효과적임.

- 종계장 부화장 방역관리요령 제10조의 2의 닭마이코플라즈마병 검사방법은 1차 ELISA 검사와 2차 균분리 검사로 구성됨. 하지만 MG, MS는 strain에 따라 pathogenecity, anitigenicity가 다르기 때문에 계군에 감염되는 strain에 따라 serologic test에 대한 sensitivity가 떨어질 수 있으며 antigenicity와 pathogenecity의 연관성이 떨어짐.
- 한 예로 MS에 이환되어 임상증상을 보이는 칠면조의 상부호흡기 스왑에서 MS 항원이 분리되었지만 항체 반응을 일으키지 않은 사례가 있었음 (Kleven, S. H et al. Avian Dis. 45:719-723. 2001)
- 국내에서 사용하고 있는 MG, MS 백신은 live attenuated vaccine이기 때문에 immunogenic하며 생성되는 항체의 양은 일정하지 않기 때문에 ELISA를 이용하여 백신주와 야외주를 감별진단할 수 없음.
- 현재 전 세계적으로 PCR 이후 염기서열비교분석을 통해 백신주와 야외주를 구분하고 있으며, 본 연구팀에서는 MG는 *mgc2*, MS는 *vlhA* 유전자를 주 타겟으로 하여 백신주와 야외주를 구별하고 있음.
- 해당 방법은 비용·시간적 측면에서 다량의 샘플을 처리하기에 적합하지 않으며, 본 연구팀의 실험 결과에 의하면 백신을 사용하지 않은 농가에서 백신주와 비슷한 유전형의 야외주가 분리되는 경우가 있어 현재 사용하고 있는 하나의 타겟 유전자로는 정확하게 백신주와 야외주를 구별할 수 없는 것으로 판단됨.
- 현재 국내 MG, MS 야외분리주의 전장 유전체 분석은 전무하며 국내 야외주와 백신주간 유전체 분석 또한 이루어지지 않았기 때문에 새로운 분자유전학적 분석의 마커를 찾기 위해서는 전장 유전체 분석이 선행되어야 함.
- 따라서 본 연구팀은 MG, MS의 전장유전체 분석을 통해 야외주, 백신주 감별이 가능한 conventional PCR, real-time PCR을 개발할 것을 제안함.

1-2. 국내·외 기술개발 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

국가과학기술정보센터 (색인어 : *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplamsa gallisepticum*)

국립수의과학검역원에서 1999년에 MG specific primer를 디자인하여 PCR을 통해 MG을 진단하는 방법이 개발되었다. (Detection of *Mycoplasma gallisepticum* using polymerase chain reaction 이영주, 1999) 또한 2003년에는 MS를 PCR을 통해 진단하는 방법이 개발되었다.

(Establishment of a diagnostic method for *Mycoplasma synoviae* using polymerase chain reaction Lee Y. J., 2003)

전남대학교에서 MS의 vlhA C-말단 분획을 이용한 ELISA 진단이 개발되었다. (ELISA using a recombinant C-terminal fragment of *Mycoplasma synoviae* vlhA 이세미, 2009)

키프리스 (색인어 : *Mycoplasma*, PCR)

또한, 세포치료제 혹은 생물학적 의약품에 오염되는 *Mycoplasma*를 PCR로 검출하는 키트는 다수 개발되어 있지만, (Method for detecting *Mycoplasma* contaminated in therapeutic cells or biological medicine by using polymerase chain reaction and kit for the same method, 솔젠트(주), 2019, Primer set, Taqman probe, and real-time PCR method for the detection of *Mycoplasma*, 한남대학교 산학협력단, 2015) 진단 목적으로 *Mycoplasma*를 간편하게 검출할 수 있는 키트는 개발되어 있지 않다.

○ 시장현황

국가과학기술정보센터 (색인어 : *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*)

2016년 전북지역의 농장을 대상으로 한 MG, MS의 양성률을 ELISA 및 PCR로 검사해본 결과, ELISA에서는 각각 75%, 94%의 항체 양성률을 보였고, PCR에서는 MS는 94%의 농가에서 유전자 양성률을 보였지만 MG의 유전자는 검출되지 않았다. (Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* infection in broiler breeder in Jeonbuk providence, Korea 광길한, 2016)

Diseases	No. of farms		No. of flocks		No. of broiler breeder	
	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)
MG	16	12 (75%)	49	32 (65.3%)	1,469	232 (15.7%)
MS	33	31 (94%)	95	80 (84.2%)	2,852	1,436 (50.4%)

ELISA 양성률

Diseases	No. of farms		No. of flocks		No. of broiler breeder	
	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)	Test	Positive (%)
MG	12	0	32	0	930	0
MS	18	16 (94%)	39	32 (82%)	1,170	733 (62.6%)

PCR 양성률

○ 경쟁기관현황

현재 강원대학교 수의과대학에서 마이코플라스마에 대한 연구가 진행되고 있으나, 마이코플라스마 예방접종축과 자연감염축을 구분 및 검출하는 연구가 활성화 되어있지 않음.

○ 지식재산권현황

키프리스 (색인어 : Mycoplasma synoviae)

특허 'LAMP를 이용한 닭의 골격계 질환 유발 원인균 검출용 프라이머 및 그 용도'에서 MS를 등온 증폭 방식으로 검출할 수 있는 프라이머 세트 및 검출방법이 개발되었다.

○ 표준화현황

행정규칙 '종계장·부화장 방역관리요령'에서는 1차 검사로 ELISA를 이용한 항체검사, 2차로 균분리를 통한 항원검사를 닭마이코플라스마(Mycoplasma gallisepticum) 검사방법으로 사용하고 있다.

○ 기타현황

국내 양계 산업에서 MS는 만성 감염이 만연한 상태임. 만성 감염인 종계균이 많아 부재종계균 선발의 예방 프로그램이 효과를 보이지 못하고 있으며 감염된 계군은 산란계의 경우 산란을 저하와 난계대 감염 및 난각단 이상(EAA)를 보이며, 육계의 경우 세균성 관절염으로 인한 운동능력 소실 및 증체를 감소로 양계 산업에서 피해가 큰 상황임.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

논문검색 (색인어 : Mycoplasma synoviae, Mycoplasma gallisepticum, vaccine strain)

Mycoplasma gallisepticum의 특정 유전자의 염기서열이 백신주와 야외주가 다른 것을 이용해 감별하는 방법이 2016년 미국에서 연구되었음.

(Identification of Strain-Specific Sequences That Distinguish a Mycoplasma gallisepticum Vaccine Strain from Field Isolates. Camir Ricketts, 2016)

○ 시장현황

Bioproperties사의 Tech bulletin에 따르면, MS 백신이 항상 항체를 높게 만들어 주지 않는다는 것과 백신이 계군의 모든 닭에 균등하게 접종되지 않는다는 것을 인정하고, 접종 유무와 함께 ELISA를 통한 항체가의 상관관계를 패턴화하여 진단 알고리즘을 설정하였다.

Antibody Response	Vaccine (6+ weeks)	Alternative explanation	Follow up
High (Pattern C)	+/- Field challenge? No problem	Field challenge: Problem	PCR History
Medium (Pattern A)	Usual	Early field challenge	PCR Rebleed
Low to zero (Pattern B)	Can happen especially before lay	Poor vaccination	PCR Rebleed

○ 경쟁기관현황

논문검색 (색인어 : Mycoplasma synoviae, Mycoplasma gallisepticum, melt curve analysis)
호주 멜버른 대학에서는 metling curve 분석법을 통해 마이코플라즈마의 백신주와 야외주를 구분하는 방법을 개발하였음.

1. Mycoplasma gallisepticum의 백신주와 야외주 감별

Differentiation of Mycoplasma gallisepticum strains using PCR and high-resolution melting curve analysis (Seyed A.Ghorashi, 2010)

2. Mycoplasma synoviae의 백신주와 야외주 감별

Identification of a new genetic marker in Mycoplasma synoviae vaccine strain MS-H and development of a strategy using polymerase chain reaction and high-resolution melting curve analysis for differentiating MS-H from field strains. (Ling Zhu, 2017)

○ 지식재산권현황

구글 특허(Google patent), 색인어 Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, detection

2016년 이후 현재까지 조류 마이코플라즈마 감염증을 진단하는 방법에 대한 다량의 특허가 중국으로부터 출원되었다. 또한 Multiple PCR을 통한 MS와 MG를 감별진단 하는 연구 또한 진행되었지만 전장유전체 분석을 통한 감별진단의 사례는 없다.

○ 표준화현황

세계동물보건기구(Office international des epizooties), 색인어 : Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae

세계동물보건기구에서는 조류 마이코플라스마 감염증을 진단하는 것을 크게 3가지 방법으로 권장하고 있다.

1. 직접 배양 혹은 면역학적 방법을 통한 항원검사.
2. PCR을 통한 핵산 검사. 프라이머는 아래 사진의 것을 사용한다.

The MG primers consist of the following sequences.

MG-14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

For MS, the following primers are used:

MS-F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

3. RSA, HI, ELISA와 같은 혈청검사

○ 기타현황

논문검색 (색인어 : Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, phylogenetic)

현재 세계 각국에서 Mycoplasma의 phylogenetic analysis에 대한 연구가 활성화 되어있음. 이에 맞춰 한국에서도 해당 주제의 연구가 필요함.

일본

Analysis of a Japanese field isolate of Mycoplasma gallisepticum using partial nucleotide sequence of Phase-variant Protein A gene (S Hirano, 2017)

중국

Phylogenetic and pathogenic analysis of Mycoplasma Synoviae isolated from native chicken breeds in China (S Sun, 2017)

1-3. 선행연구

1. MS 국내 야외분리주 분리

(1) MS 국내 야외 분리주 확보 및 MS 유전자형 검사 결과

- 본 연구팀에서는 선행 연구로써 병성감정을 통하여 10개의 MS 양성 국내 야외주 시료를 확보하였으며, 그 중 3번의 연속적인 Colony picking을 이용하여 샘플내에 존재하는 비병원성의 Mycoplasma 들을 제거하고 4개의 순수 MS 국내 야외주를 분리함 (A4, G, T, 5b).

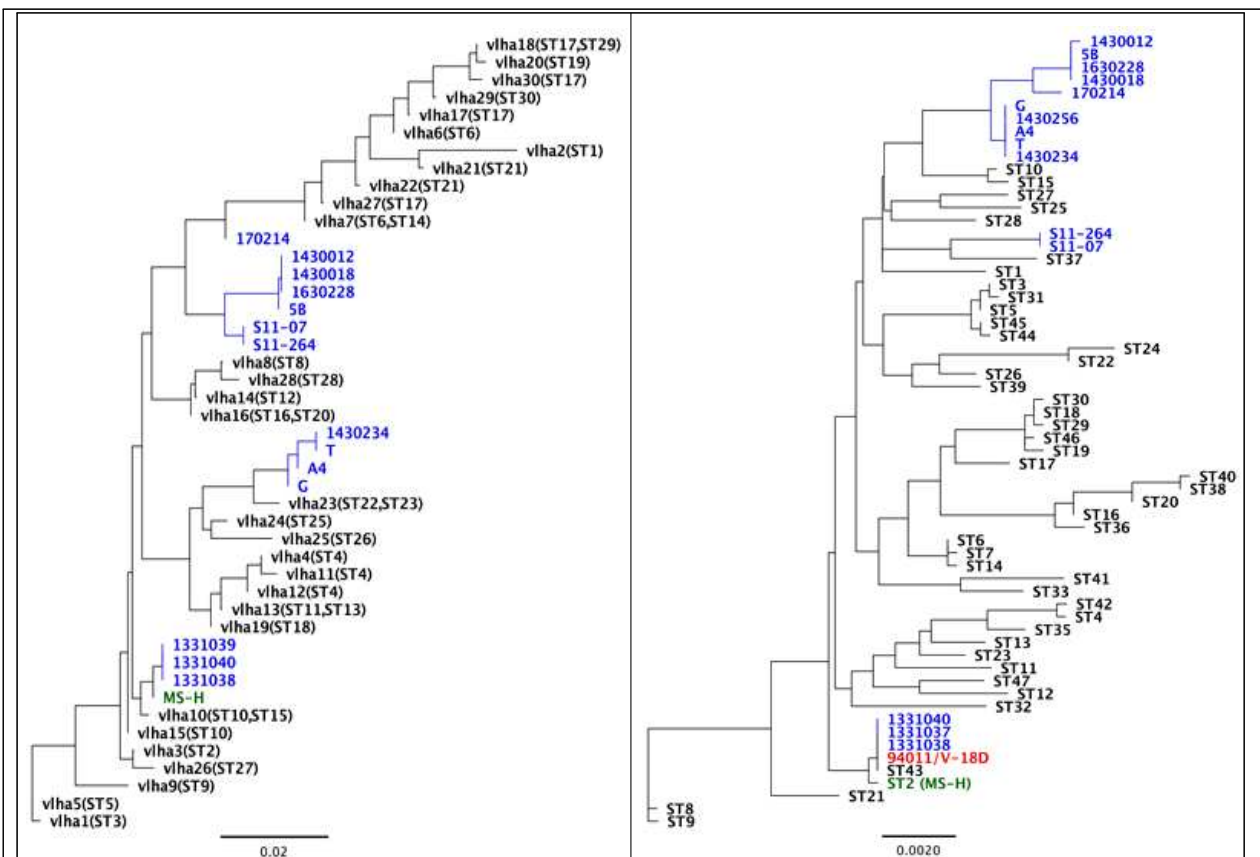
- 과거부터 현재까지 국내에서 유행했던 MS 야외주의 유전자형을 확인하기 위해, 총 15개의 MS 양성 시료에서 확보한 MS 국내 야외주의 genomic DNA를 이용하여 vlhA gene을 PCR로 증폭하여 산물의 염기서열을 확정함. 또한 이와는 별개로, 7개의 House keeping gene을 PCR로 증폭하여 산물의 염기서열을 비교하는 Multi locus sequence typing (MLST)를 진행함. 각각 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 기존에 알려져 있던 상업용 백신주와 외국의 야외주를 포함하여 비교분석하여 국내 유행하는 MS 야외주의 계통분석을 실시함 <표1, 2 및 그림1, 2>.

<표 1> vlhA gene PCR염기서열 분석을 위한 프라이머 염기서열

Gene	Forward primer Sequence (5' to 3')	Reverse primer Sequence (5' to 3')
vlhA	GGCCATTGCTCCTRCTGTTAT	AGTAACCGATCCGCTTAATGC

<표 2> MLST PCR염기서열 분석을 위한 타겟 유전자와 프라이머 염기서열

Gene	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
Adk	GCTTTGGATTAGATTCWGAGCTA	TTCTTATGGGAATGCCAGGTT
atpG	GCTACAATTTTCGGTTATTTCTTGAG	ATGCTATGCAGYTGTTTTCTACTT
Efp	CGACATATTTACCGGTTTTCAGTT	CTGGAATTACATTTCAAGATTCAGGAA
Gmk	TCAATGTCTAACTCCTTGTGAAGA	TTTACAGGTCCATCAGGTGTT
nagC	CCGATTATTCCGGCGTTATT	ATYGGGGGCACTTCTATTAAT
Ppa	AGTAATTGAAATTCCAAAGGCTCA	AACTATATTTCTCTGGATGTTTTTCTT
recA	CTTTACCTTGCGCTACGTTATT	TTCGAAAAGAATCTATTATGGTTC



<그림 1>

MS 국내 야외주와 백신주 및 해외 유래 야외주 간의 vha gene 유전자형 분석 phylogenetic tree analysis
국내 분리주 (파란색)/ 상업용 백신 (녹색)

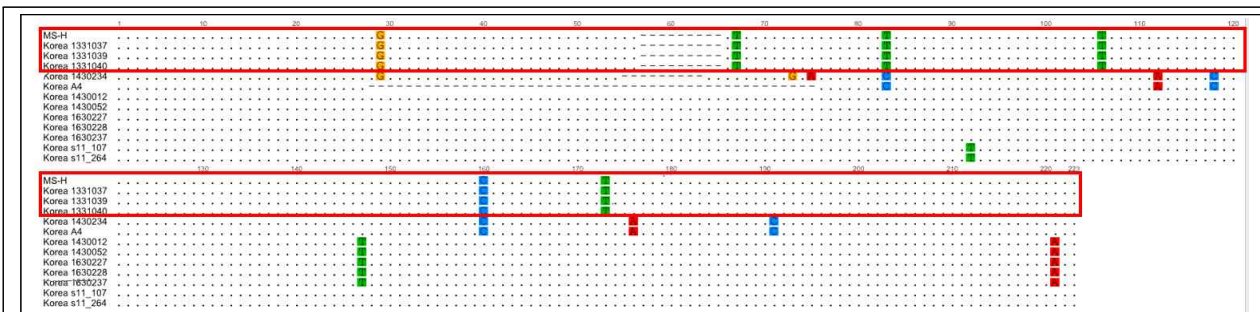
<그림 2>

MS 국내 야외주와 백신주 및 해외 유래 야외주 간의 MLST 유전자형 분석 phylogenetic tree analysis
국내 분리주 (파란색)/ 상업용 백신 (녹색)/ 호주 병원성 야외주 (빨간색)

- vha gene 유전자형 분석과 MLST 유전자형을 분석한 결과 본 연구실에서 분리한 국내 MS 야외주는 분리된 연도에 따라 발생한 MS가 유전형의 상관관계를 보였음. vha gene과 MLST target 유전자의 염기서열을 사용한 계통분석에서 MS 국내 야외주는 크게 세 그룹의 유전자형으로 분류됨.

- 특이하게 14년도에 발생한 MS는 vha gene 분석에서는 두가지 유형으로 나뉘었지만 MLST 결과에서는 한가지 유형을 보임. 이는 같은 조상을 가지는 MS가 호스트내에서 숙주의 면역기전을 회피하여 생존하기 위해 다른 vha gene 유형을 가진 것으로 보임.

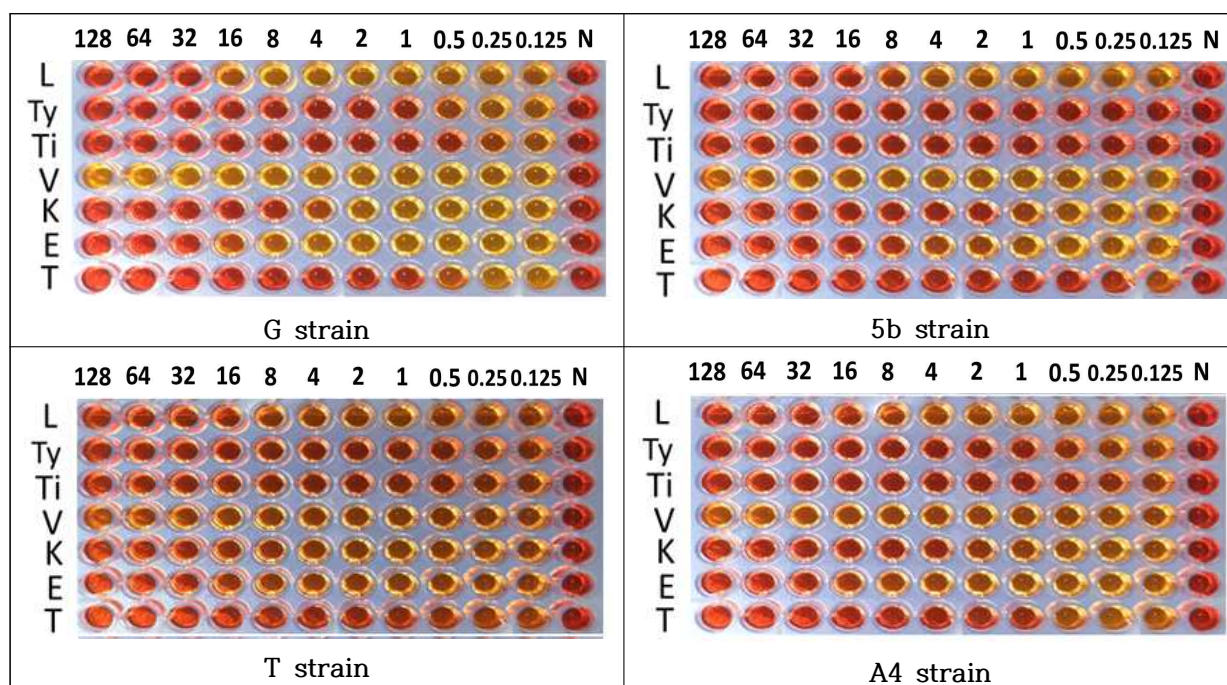
- 13년도에 분리된 MS 국내 야외주의 유전자형은 vha, MLST 모두 호주에서 공격접종 균주로 사용하는 94011/V-18D, 온도민감성 생독백신인 MS-H와 유전자형이 같은 그룹에 속함을 보이며 vha gene alignment 상에서 차이가 발견되지 않아 현재 백신주와 야외주를 감별하기 위해 사용하고 있는 vha 유전자가 국내에서 백신주와 야외주를 모두 감별하기에는 적합하지 않은 것으로 확인됨.



<그림 3> 한국 MS 분리주와 MS-H의 vlha gene 유사성

(2) 순수 분리된 MS 국내 야외분리주에 대한 6개 항생제의 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test 결과

- 순수 분리된 4주의 *Mycoplasma synoviae*에 대하여 국내에서 *Mycoplasma synoviae* 치료에 빈번하게 사용하는 6개 항생제에 대해 항생제 최소 억제농도 실험을 진행함 <그림4, 표3>.



<그림4>

순수분리 된 4주의 MS 국내 야외분리주의 MIC 결과 (G, 5b, T, A4)

N:negative, L:Lincomycin+Spectinomycin, V:Vancomycin(-control), K:Kanamycin, Ti:Tiamulin, Ty:Tylosin, E: Enrofloxacin, Te:Tetracycline

항생제는 처음 농도에서 연속적으로 2진 희석을 진행함 (ug/ml)

<표 3> MS 국내 야외분리주 항생제 최소억제농도 요약

Strains**MIC (ug/ml)**

	Linsmycin	Tylosin	Tiamulin	Kanamycin	Enrofloxacin	Tetracycline
G	32	1	1	8	32	1
5b	16	<0.125	<0.125	8	32	1
T	16	1	1	4	32	1
A4	16	1	1	16	32	1

- 순수 분리된 4주의 MS 국내 야외분리주는 Tiamulin, Tylosin, Tetracycline에 낮은 MIC 결과를 보여 이들에 대한 감수성을 나타내었으나, 국내 농장에서 MS 치료를 위해 빈번하게 사용되는 Linsmycin과 Enrofloxacin에 높은 MIC 결과를 보여 자주 사용되는 항생제에 대해서는 공통적으로 내성을 갖고 있음.

(3) MS 국내 야외분리주의 Complete genome sequence 분석

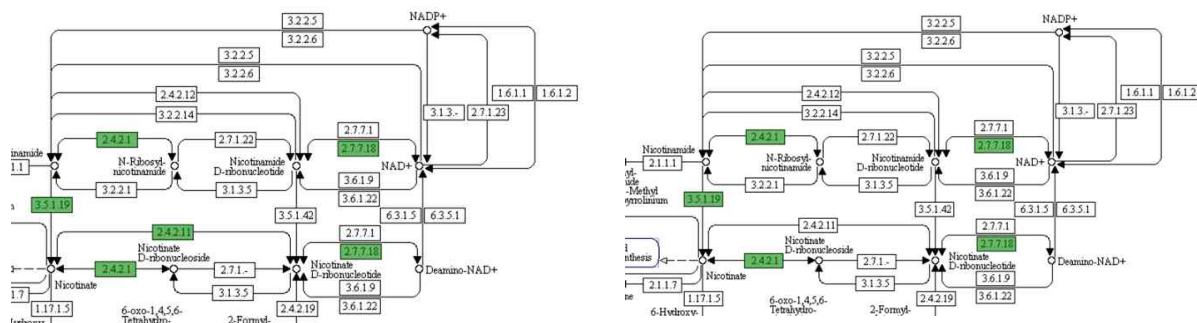
- MS 국내 야외분리주의 유전자적 특징을 확인하기 위하여 A4 strain을 NGS 기술인 Pacbio platform 을 이용하여 Complete genome sequence의 염기서열을 분석함. A4 strain의 genome 크기는 총 길이 790,352 bp로 지금까지 알려진 2개의 MS Complete genome sequence (MS53, 799,476 bp; WVU1853, 846,495 bp)보다 짧았음. 3개의 MS Complete genome sequence의 Encoded CDS를 비교한 결과 각 strain마다 특징적으로 가지고 있는 유전자가 존재함 <표4>.

<표 4> MS strain의 Encoded CDS의 차이

Genes	A4	MS53	WVU1853
Nicotinate phosphoribosyltransferase	+	-	-
RecU Holliday junction resolvase	+	-	+
Signal peptidase I	-	+	+
Type I restriction-modification system, DNA-methyltransferase subunit M	-	-	+
Type I restriction-modification system, restriction subunit R	-	-	+
Type I restriction-modification system, specificity subunit S	-	-	+

- 그 중 Nicotinate phosphoribosyltransferase는 본 연구에서 분리한 국내 야외분리주만 갖고 있으며, 이 유전자는 MS를 실험실내에서 배양하기 위해 사용되는 Modified frey's medium에 필수적으로 첨가되는 Nicotinamide adenine dinucleotide 대사에 관련됨.

- 이를 In silico로 확인하기 위해 3개의 MS Complete genome sequence를 KEGG: Kyoto Encyclopedy of Genes and Genomes에 업로드 하여 Nicotinamide adenine dinucleotide대사를 비교함 <그림5>



<그림 5> Nicotinamide adenine dinucleotide 대사 (좌: A4 strain, 우: WVU1853, MS53)

- 국내 분리주인 A4 strain은 브라질에서 분리된 MS53, 미국에서 분리된 MS type strain인 WVU1853 과 달리 Genome내에 EC number 2.4.11인 Nicotinate phosphoribosyltransferase가 존재하여 다른 Nicotinamide adenine dinucleotide 대사를 보여줌.

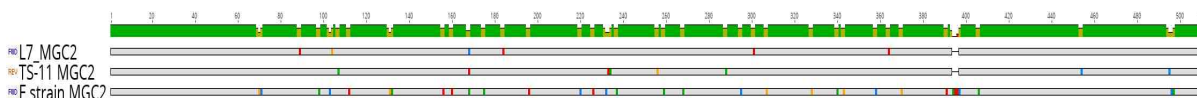
- 이는 MS를 실험실 내에서 배양하기 위해 배지를 조성할 때 MS 생장에 있어 Nicotinamide adenine dinucleotide 의 필요성이 strain 마다 다르며 (Yagihashi & Kato, 1984) Medium supplement 로 Nicotinamide adenine dinucleotide 대신 Nicotinamide를 넣었을 때 MS가 성장한다는 논문과 (DaMassa & Adler, 1975)와 상관성이 있음.

2. MG 야외분리주 분리

- 본 연구팀은 국내 양계농장에서 의뢰한 병성감정 시료에서 하나의 MG를 순수 분리하였고, *Mycoplasma gallisepticum* Specific primer <표 5>를 사용하여 Molecular Typing 한 결과, 본 연구 팀에서 분리한 MG는 국내에서 사용하고 있는 백신주 F-strain, TS-11들과 다른 한국 야외분리주임을 확인하였음 <그림 6>.

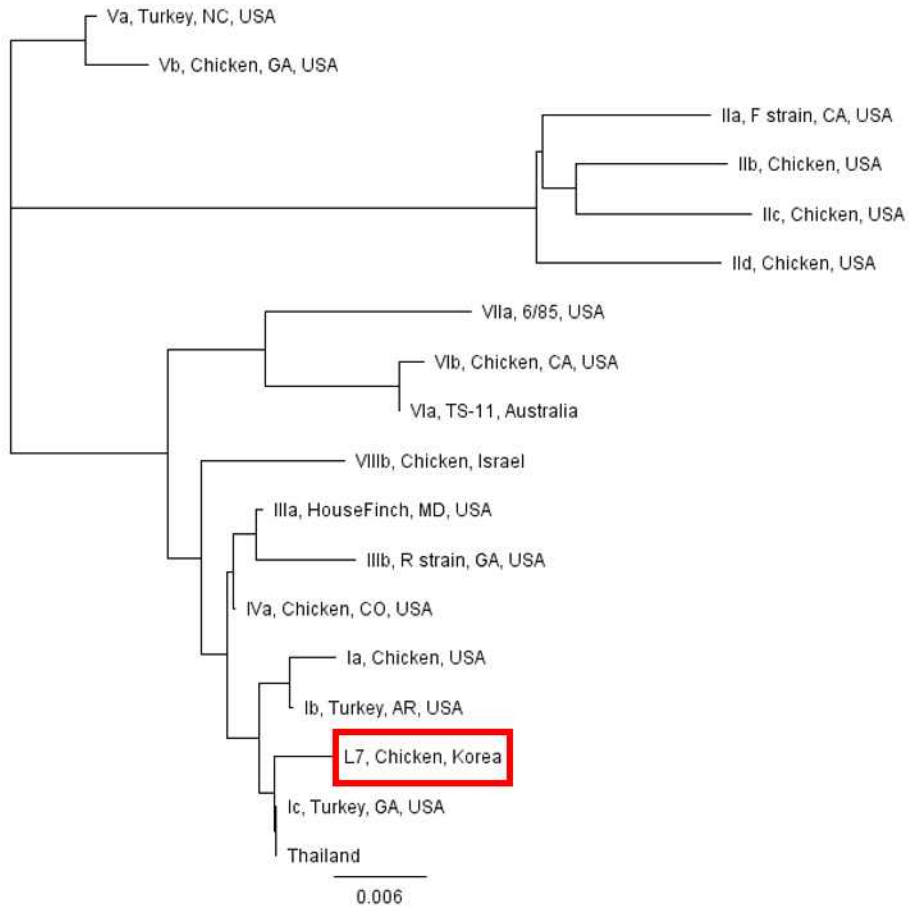
<표 5> *Mycoplasma gallisepticum* primer 정보

Gene	Forward Primer Sequence(5' to 3')	Reverse Primer Sequence(5' to 3')
mgc2	TGGGATTCCGATCGCTAAGAA	TAAACCCACCTCCAGCTTTATTC



<그림 6> 국내 유행 백신주와의 MGC2 gene alignment

- 본 연구팀에서 분리한 MG의 MGC2 gene sequencing 결과를 BLAST한 결과 태국에서 보고된 MG 야외주와 가장 유사하다는 결과를 얻었음. 기존에 보고된 MGC2 gene typing을 하여 비교분석한 결과, MGC2 type Ic와 유사하나 sequence상에 차이가 있어 새로운 한국 야외주임을 알 수 있었음. <그림 7>



<그림 7> 기존 보고된 *Mycoplasma gallisepticum*들의 MGC2 gene을 국내야외분리주인 L7 strain과 비교한 phylogenetic tree

3. MS 시료별 균분리동정의 차이

- 본 연구팀은 MS 시료에 따른 균분리동정의 차이를 확인하기위해 MS-H 백신을 접종한 종계군에서 백신 접종 10주 뒤에 서로 다른 시료 (Airsac swab, Trachea swab, Trachea+Cleft swab, Trachea 조직)를 이용하여 PCR, Culture 양성률을 비교하였음<표6>.

- PCR은 시료 채취 후 DNA를 뽑아 MS specific PCR을 진행하였으며, Culture는 시료 채취 후 Modified frey broth에 접종하여 0.45um로 필터하여 색변화를 2주 동안 관찰하였음.

- 실험결과 PCR을 이용한 검출법에서는 Trachea 조직을 이용한 시료가 가장 높은 양성률이 높았으며 Culture를 이용한 검출법에서는 Trachea+cleft swab이 가장 높은 양성률을 보였음. Trachea 조직을 이용한 시료가 가장 높은 양성률이 나왔으나 조직을 얻는 것은 실제 임상에서 활용하기는 어려움. 따라서 MS 균분리를 위해서는 Trachea+Cleft swab 시료를 사용해야된다고 판단됨.

	Airsac	Airsac	Trachea	Trachea	Trachea+Cleft	Trachea+Cleft	Trachea Section	Trachea Section
1	-	-	-	+	+	+	-	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	+	-	+	-	+
11	-	-	+	-	+	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	+	-	+
14	-	-	+	+	+	+	+	+
15	-	-	+	-	+	-	-	-
Culture			7		10		9	
PCR				7		10		12

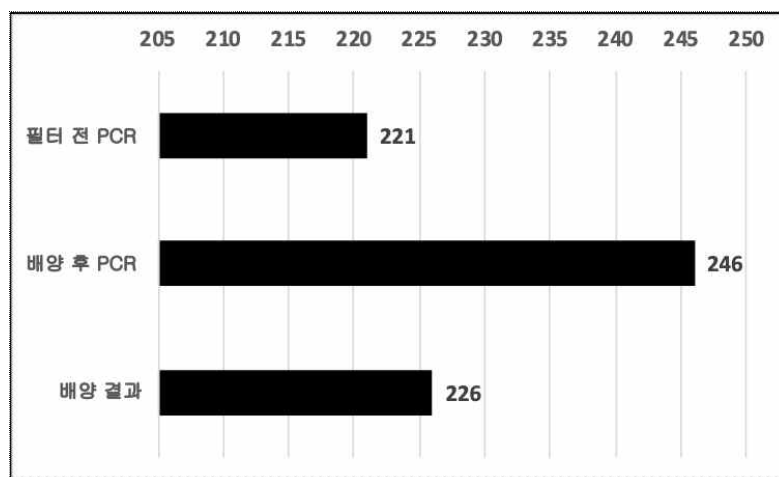
<그림 8> MS 시료별 균분리동정의 차이, Culture (Red) PCR(Blue)

4. MS 시료 처리 방법에 따른 균분리동정의 차이

- 본 연구팀은 MS 시료 처리 방법에 따른 균분리동정의 차이를 확인하기 위해 23 농장에서 총 335마리의 닭의 Trachea+Cleft swab을 이용하여 0.45um 필터 전 PCR 결과, 0.45um 필터 후 Culture 결과 및 PCR 결과를 비교하였음.

- Trachea+Cleft swab 시료를 Modified frey broth에 접종한 후 0.45um 필터 전에 DNA를 뽑아 필터 전 PCR을 진행하였으며 나머지 샘플은 0.45um 필터 후 37°C에서 배양하여 2주동안 색변화를 관찰하였음. 2주 뒤에 DNA를 뽑아 배양 후 PCR을 진행하였음.

- 배양 후 PCR에서 가장 높은 양성률이 높았으며 필터 전 PCR에서 양성률이 가장 낮음을 확인하였음 <그림9>. Swab 시료에서 바로 DNA를 뽑아 PCR을 진행한다면 실제 양성률 보다 낮게 나타날 수 있음을 확인함.



<그림 9> MS 시료 처리 방법에 따른 균분리동정의 차이

1-4. 연구개발의 목표 및 내용

구분	내용
최종목표	<p>[최종목표]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 닭 마이코플라즈마병(MG, MS) 자연감염축과 예방접종축 감별 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Real-time PCR 기반 야외주 및 백신주 감별 진단법 개발 - Conventional PCR 기반 야외주 및 백신주 감별 진단법 개발 - 분석적 민감도: $10^2 \sim 10^1$ copies/μl - 분석적 특이도: 목표 대상에만 특이적으로 반응 - Real-time PCR 정밀도: CV value < 5 % ○ 닭 마이코플라즈마병(MG, MS) 감별진단 PCR의 산업화
세부목표	<p>[주요내용]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 닭 마이코플라즈마 병(MG, MS)의 야외 분리주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 백신 유래주가 아닌 국내 야외분리주 각 8주 이상 확보 - Colony picking을 통해 다른 마이코플라즈마균이나 세균에 오염되지 않은 순수 분리주 확보 ○ 국내 닭 마이코플라즈마 병(MG, MS)의 야외 분리주의 전장유전체 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 완전한 circular 형태, error correction이 완료된 전장유전체 5주 이상 확보 ○ 전장유전체 비교 분석을 통한 닭 마이코플라즈마 병(MG, MS) 야외 분리주와 국내 시판중인 백신주간 감별 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 획득한 국내 야외분리주 전장유전체와 국내에서 사용중인 백신주의 전장유전체를 비교 분석하여 국내 야외분리주와 백신주를 감별할 수 있는 특이적인 유전자 또는 SNP 발굴 - 감별 가능한 특이유전자 또는 SNP 부위를 적용한 Conventional PCR 및 Real-time PCR 진단법 개발 ○ 감별 진단법의 민감도 및 효능평가 <ul style="list-style-type: none"> - 실험실에서 순수 분리된 국내 야외 분리주 및 백신주를 이용한 감별 진단법 평가 - 백신예방접종 농장과 자연감염 농장 시료를 이용한 감별 진단법 평가

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

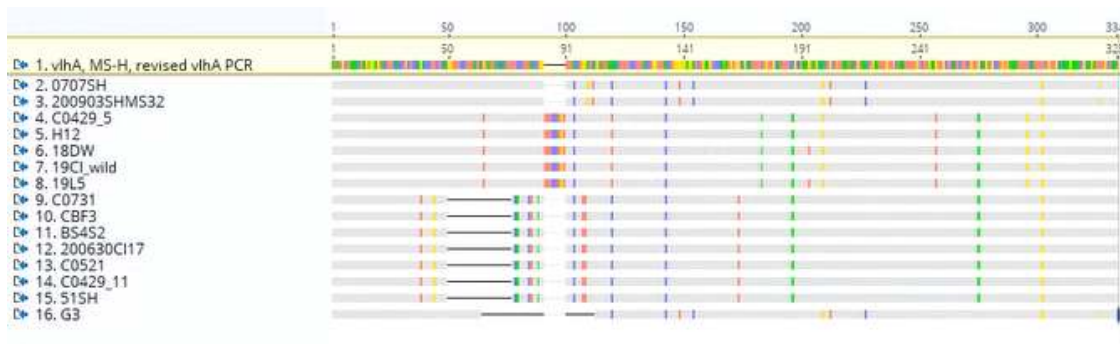
1. 닭 마이코플라스마 야외주 분리

1-1. 마이코플라스마 시노비에(*Mycoplasma synoviae*, MS) 야외주 분리

- 본 연구팀에서는 체리부로 및 병성감정, 두 가지 경로로부터 획득한 시료에서 MS specific PCR을 통하여 MS 양성여부를 확인함 <표 1>.
- PCR 결과물의 염기서열을 Sanger sequencing을 통해 획득하였고, 이를 상용화 백신주 (MS-H)의 염기서열과 비교분석하여 백신주와 염기서열이 다른 총 6개의 야외주를 확인하였음.
- 추가로 선행연구를 통해 확보한 10주의 야외주를 함께 사용하여 순수분리 및 전장유전체 획득 후보를 선정함 <그림 1>.

<표 1> vlhA gene PCR을 위한 프라이머 염기서열>

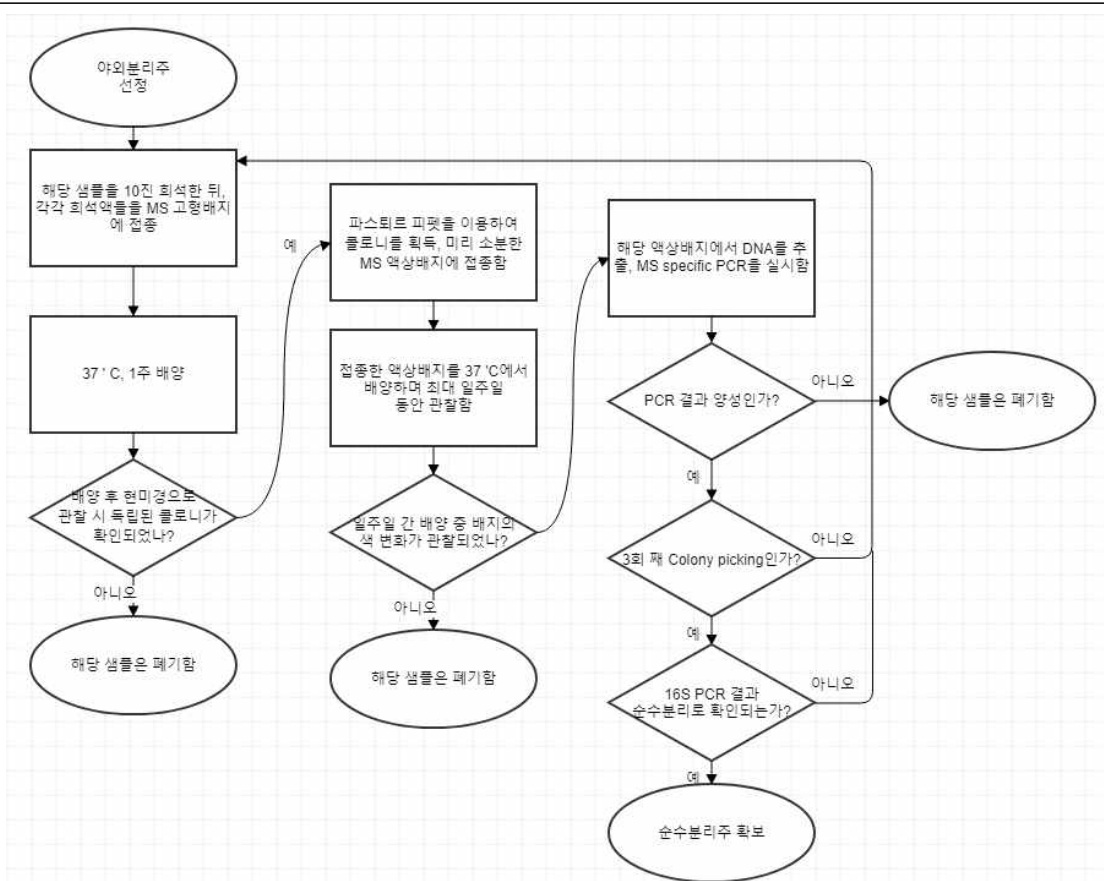
Gene	Forward primer sequence(5' to 3')	Reverse primer sequence(5' to 3')
vlhA	GGCCATTGCTCCTRCTGTAT	AGTAACCGATCCGCTTAATGC



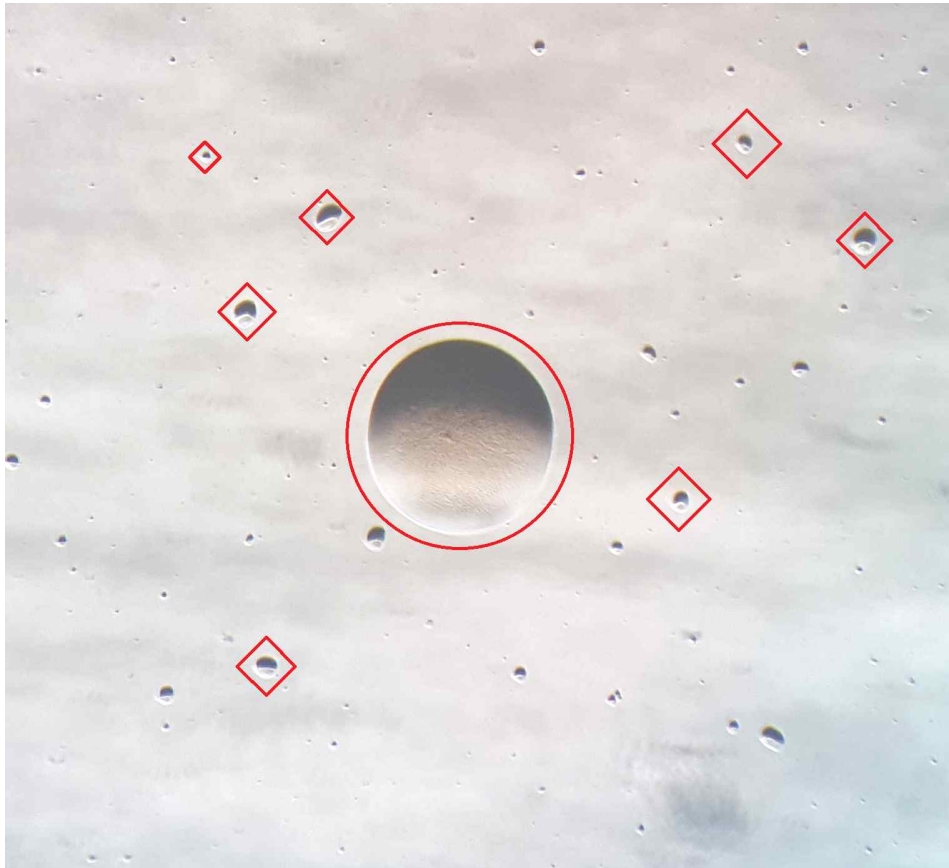
<그림 1> 야외주들과 백신주의 vlhA 유전자 염기서열 비교.
MS-H의 vlhA gene을 reference로 설정함.

1-2. Colony picking을 통한 야외분리주들의 순수분리 및 확인

- MS 야외분리주들의 전장유전체 확보를 위해 총 3회의 colony picking을 실시하여 순수분리주를 획득함 <그림 2>.
- Colony picking 과정 중, 현미경 상에서 매끄러운 원형 또는 타원형의 콜로니를 획득했으며, 주변의 다른 콜로니가 포함되지 않도록 실시했음 <그림 3>.
- 각각의 Colony picking 후에 vlhA gene을 타겟으로 하는 MS specific PCR을 실시했으며, 3회의 Colony picking을 실시한 후에는 16S rRNA 타겟 PCR을 실시함. 16S rRNA PCR 결과물들의 염기서열을 BLAST 및 MS 표준균주와의 비교분석을 통해 MS 이외의 다른 균이 존재하지 않음을 재확인함 <표 2>, <그림 4>, <그림 5>.



<그림 2> MS야외분리주의 순수분리 과정



<그림 3> Colony picking을 실시한 콜로니의 형태
(원: 병원성 마이코플라스마, 마름모 : 비병원성 마이코플라스마 또는 이물질)

<표 2> 16S rRNA sequencing을 위한 프라이머 염기서열

Gene	357F (5' to 3')	926R (5' to 3')
16s rRNA	CCTACGGGAGGCAGCAG	CCGTCAATTYMTTTRAGT



<그림 4> MS 표준균주와 Colony picking을 끝낸 야외분리주들의 16S rRNA PCR 비교분석

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info
Bit-S...	E Value	Grade	Hit start Hit end Name Description % Pairwise Identity Seq...
1,003.85	0	97.2%	1 545 U04645 Mycoplasma synoviae WVU1853 16S rRNA...
1,061.1	0	99.9%	6 582 MK737935 Mycoplasma sp. strain D119_259_012_PCR...
1,061.1	0	99.9%	308 884 MH539051 Mycoplasma synoviae strain B2777-15A-7...
1,061.1	0	99.9%	703,235 702,659 LS991953 Mycoplasma synoviae strain NCTC10124 ...
1,061.1	0	99.9%	375,836 375,260 KP704286 Mycoplasma synoviae strain MS-H. comp...
1,061.1	0	99.9%	282 858 KP318328 Uncultured Mycoplasma sp. clone ZCHP/...
1,061.1	0	99.9%	556,149 556,725 CP034544 Mycoplasma synoviae strain HN01 chrom...
1,061.1	0	99.9%	785,942 785,366 CP029258 Mycoplasma synoviae strain 86079/7NS c...
1,061.1	0	99.9%	785,995 785,419 CP021129 Mycoplasma synoviae strain MS-H chrom...
1,061.1	0	99.9%	701,603 701,027 CP011096 Mycoplasma synoviae ATCC 25204. comp...
1,061.1	0	99.9%	666,281 665,705 AE017245 Mycoplasma synoviae 53, complete genome
1,046.32	0	99.2%	1 569 MF319540 Mycoplasma synoviae strain CHN-SQ12-2...
1,046.32	0	99.2%	1 569 MF319539 Mycoplasma synoviae strain CHN-SQ27-2...
1,046.32	0	99.2%	1 569 MF319538 Mycoplasma synoviae strain CHN-SQG1-...
1,044.48	0	99.1%	2 569 KY750311 Mycoplasma synoviae strain CHN-WF224-...

<그림 5> Colony picking을 끝낸 야외분리주들의 16S rRNA PCR BLAST 결과

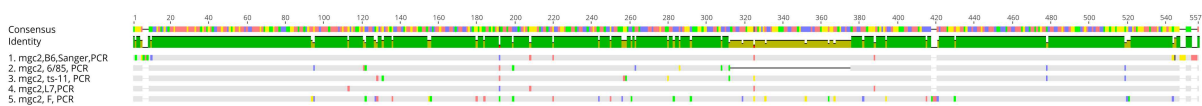
- 순수분리가 확인된 야외주들은 100ml의 액상배지에 접종하여 증균 후, stock을 실시함. 이후 실험에서 stock된 균주를 사용함.

1-3. 마이코플라즈마 갈리셉티쿰(*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 야외주 분리

- 마이코플라즈마 갈리셉티쿰의 분리는 1차년도와 2차년도에 걸쳐 이루어졌으며, 실험의 진행과정은 MS의 분리와 유사하게 이루어졌음.
- MG 의심 시료들의 genomic DNA를 획득하여 MG specific PCR을 통하여 MG 양성여부를 파악함. PCR 결과 MG 양성으로 확인되면 Sanger sequencing을 진행, PCR 결과물의 염기서열을 백신주들의 염기서열과 비교분석하여 야외주 여부를 판명하였음. <표 3>, <그림 6>

<표 3> mgc2 gene PCR을 위한 프라이머 염기서열

Gene	Forward primer sequence(5' to 3')	Reverse primer sequence(5' to 3')
mgc2	GGCCATTGCTCCTRCTGTAT	AGTAACCGATCCGCTTAATGC



<그림 6> 야외주들과 백신주들의 mgc2 gene 염기서열 비교.

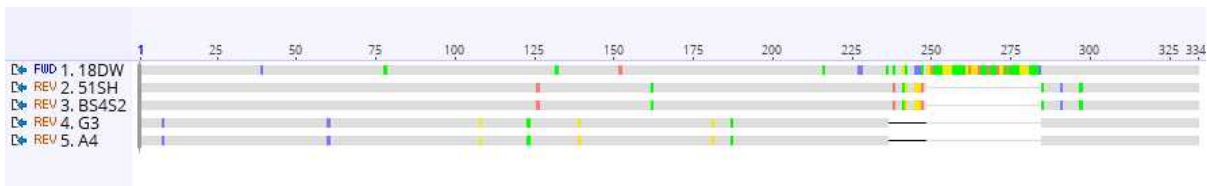
2. 국내 닭 마이코플라즈마 병 원인체 야외분리주의 전장유전체 시퀀싱 및 조립

2-1. 마이코플라즈마 시노비에의 전장유전체 시퀀싱 및 조립

- 전장유전체 확보를 위한 야외주는 순수분리한 8개의 MS 야외주와 기존 분리한 야외주 A4 중 *vlhA* 유전자의 염기서열이 중복되지 않고, 중복될 경우, 분리일, 분리장소가 상이한 야외주를 선택하였으며 해당 기준들로 선택한 야외주의 *vlhA* 염기서열과 메타데이터는 다음과 같음 <표 4>, <그림 7>.

<표 4> 전장유전체 획득 MS야외주의 메타데이터

샘플명	분리일	입수경로	Host	분리 방식
18DW	2018년	의뢰실험	닭	tracheal swab
51SH	2020년 7월	병성감정	닭	tracheal swab
BS4S2	2019년 7월	의뢰실험	닭	tracheal swab
G3	2015년	병성감정	닭	tracheal swab
A4	2015년	병성감정	5주령 병아리	synovial fluid



<그림 7> 전장유전체 확보 MS 야외주들의 *vlhA* sequence

- 전장유전체 확보를 위해 각 strain을 일주일간 배양한 50ml의 액상배지를 사용하였으며 10,000×g, 30min centrifuge 후, PBS를 사용해 1회 washing을 실시함.
- Illumina sequencing을 위한 DNA extraction은 QIAmp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 진행하였으며, extracted DNA 농도가 50ng/ul, purity가 260/280 > 1.2, 전기영동상에서 DNA의 degradation이 관찰되지 않은 경우에 Illumina sequencing을 진행하였음.
- Illumina sequencing의 library preparation은 TruSeq Nano DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용, NextSeq 500 플랫폼에서 진행하였으며 결과는 <표 5>와 같음.

<표 5> MS야외주 Illumina sequencing 결과

샘플명	read-pairs	yield(bases)	OverQ30 bases(%)	Read-length	Run-type
18DW	5,199,410	1,570,221,820	89.5	2X151	Paired-end
51SH	5,316,830	1,605,682,660	89.05	2X151	Paired-end
BS4S2	5,518,102	1,666,466,804	89.55	2X151	Paired-end
G3	5,770,952	1,742,827,504	89.2	2X151	Paired-end
A4	23,563,014	2,379,928,014	93.182	2X101	Paired-end

- Oxford Nanopore MinION sequencing을 위한 DNA extraction은 MagAttract HMW DNA kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 진행하였으며, extracted DNA 농도가 20.41ng/ul, DNA purity가 260/280에서 1.8~2.0 범위에 260/230에서 2.0~2.2 범위에 있으며, 전기영동상에서 DNA의 degradation이 관찰되지 않은 경우에 Oxford Nanopore MinION sequencing을 진행하였음.
- MinION sequencing에 필요한 DNA library는 SQK-LSK109 kit을 사용하여 제작하였으며 FLO-MIN106 flow cell 을 사용하여 48시간 동안 sequencing을 진행함. Fast5 파일의 basecalling에는 guppy basecaller를 사용함.

- Oxford Nanopore MinION sequencing 결과는 다음과 같음 <표 6>.

<표 6> MS 야외주들의 MinION sequencing 결과

샘플명	total number of reads	yields(bases)	N50
18DW	582,624	2,813,690,282	16143
51SH	304,770	727,154,642	5000
BS4S2	59,773	289,828,674	10545
G3	870,905	2,614,091,061	7352
A4	656,186	2,769,672,396	15963

- MinION sequencing에서 생성된 long read와 Illumina sequencing read를 Unicycler-hybrid (<https://github.com/rrwick/Unicycler>) 방법을 사용하여 전장유전체를 조립함.

- 조립한 전장유전체는 세균 annotation tool인 Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>)를 사용하여 annotation을 진행함.

- 조립한 전장유전체 결과와 annotation 결과는 <표 7>과 같으며 총 5주의 error correction이 완료된 circular 형태의 마이코플라즈마 시노비에 전장유전체를 획득함.

<표 7> MS야외주의 전장유전체 조립 결과

샘플명	Sequence length	GC contents	CDS	tRNA	circular	contig
18DW	817,949	28.4%	710	34	0	1
51SH	809,329	28.4%	706	34	0	1
BS4S2	794,771	28.4%	685	34	0	1
G3	785,748	28.4%	701	34	0	1
A4	790,325	28.4%	706	34	0	1

2-2. 마이코플라즈마 갈리셉티쿰의 전장유전체 시퀀싱 및 조립

- 전장유전체 획득 MG 야외주들의 정보는 다음과 같음 <표 8>, <그림 8>.

<표 8> 전장유전체 획득 MS야외주의 메타데이터

샘플명	분리일	입수경로	Host	분리 방식
L7	2018년	의뢰실험	닭	tracheal swab
B6	2020년 7월	병성감정	닭	tracheal swab



<그림 8> 전장유전체 확보 MG 야외주들의 mgc2 sequence

- Illumina 및 Oxford Nanopore sequencing은 마이코플라즈마 시노비에와 동일한 방법을 사용하여 진행하였으며 결과는 <표 9>, <표 10>과 같음.

<표 9> MG야외주 Illumina sequencing 결과

샘플명	read-pairs	yields(bases)	OverQ30 bases(%)	Read-length	Run-type
L7	5,199,410	1,570,221,820	89.5	2X151	Paired-end
B6	5,316,830	1,605,682,660	89.05	2X151	Paired-end

<표 10> MG야외주들의 MinION sequencing 결과

샘플명	total number of reads	yields(bases)	N50
L7	400,260	2,538,813,699	12694
B6	668,650	2,409,954,410	17315

- 전장유전체의 조립은 MinION sequencing에서 생성된 long read를 Flye assembler (<https://github.com/fenderglass/Flye>)를 사용하여 assembly를 진행함.
- Assembly 후 생성된 contig의 error correction은 Illumina reads를 이용하여 unicycler pipeline (<https://github.com/rrwick/Unicycler>)의 unicycler_polish로 진행함.
- 조립한 전장유전체들은 Prokka annotation tool을 이용하여 annotation을 진행함.
- 조립한 전장유전체의 결과와 annotation 결과는 <표 11>와 같으며 총 2주의 error correction이 완료된 circular 형태의 마이코플라즈마 갈리셉티쿰 유전체를 획득함.

<표 11> MG야외주의 전장유전체 조립 결과

샘플명	Sequence length	GC contents	CDS	tRNA	circular	contig
L7	1,011,807	31.6%	804	32	0	1
B6	988,508	31.6%	780	32	0	1

3. 마이코플라즈마 시노비에(MS)의 자연감염축과 예방접종축 감별 진단법 개발

3-1. 국내 닭 마이코플라즈마 병(MS) 야외분리주의 전장유전체와 백신주의 전장유전체 비교분석

Sequence alignment

- 전장유전체 비교분석을 위해 NCBI에 존재하는 MS 5주를 추가로 이용하였음 <표 8>.

<표 12> 사용한 NCBI MS야외주

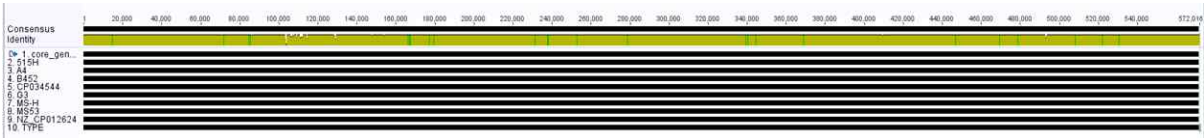
Strain	Genbank	비고
MS-H	CP021129	호주 백신주 (국내 시판중)
86079-7NS	CP012624	호주 백신주 parent 주
NH01	CP034544	중국 야외분리주
ATCC25204	CP011096	MS type strain
MS53	AE017245	브라질 야외 분리주

- 야외주 특이 유전자 또는 SNP 발굴을 위해 10주의 MS 전장유전체를 이용하여 core genome analysis를 진행하였음.
- MS는 vlha pseudogene locus가 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) homology 사이에 flank되어 있으며 이 pseudogene들은 comparative analysis를 할 때 제외함.
- core genome analysis는 Roary (<https://github.com/sanger-pathogens/Roary>)를 이용하여 진행

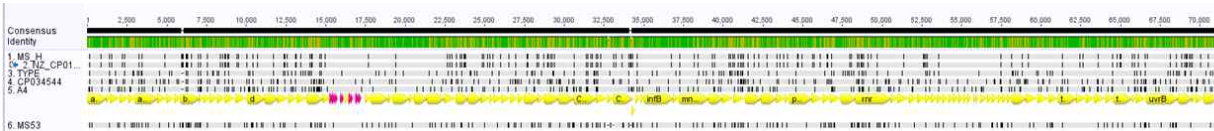
함.

- 확보된 MS 야외분리주와 백신주의 전장유전체를 비교분석 하기위한 Multiple Sequence Alignment 수행

- Core_genome Alignment 분석 결과 약 572 kb 유전자 확보 및 특이 유전자 후보군 설정 <그림 9.1>, <그림 9.2> <그림 10>.



<그림 9.1> Core_genome Alignment 분석 결과 약 572 kb 유전자 확보.



<그림 9.2> <그림 9.1>의 Core_genome Alignment 상에서 target 부분을 특정함



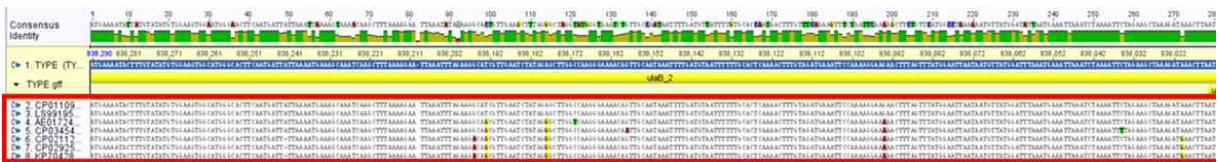
112	rsmH	HAGPAKMC_000279	LLKGNJGC_00117	PFLBLGD_00576	MEHDKHPA_00360	HJNBOCI_00080	FHOIABA_00390
113	group_240	HAGPAKMC_00034	LLKGNJGC_00381	PFLBLGD_00111	MEHDKHPA_00114	HJNBOCI_00581	FHOIABA_00111
114	group_241	HAGPAKMC_00726	LLKGNJGC_00435	PFLBLGD_00057	MEHDKHPA_00059	HJNBOCI_00526	FHOIABA_00057
115	atpH_2	HAGPAKMC_00349	LLKGNJGC_00048	PFLBLGD_00445	MEHDKHPA_00430	HJNBOCI_00149	FHOIABA_00460
116	gmk	HAGPAKMC_00060	LLKGNJGC_00357	PFLBLGD_00135	MEHDKHPA_00139	HJNBOCI_00606	FHOIABA_00135
117	group_244	HAGPAKMC_00005	LLKGNJGC_00409	PFLBLGD_00083	MEHDKHPA_00085	HJNBOCI_00552	FHOIABA_00083
118	rpsO	HAGPAKMC_00535	LLKGNJGC_00640	PFLBLGD_00622	MEHDKHPA_00605	HJNBOCI_00324	FHOIABA_00640
119	group_246	HAGPAKMC_00489	LLKGNJGC_00683	PFLBLGD_00578	MEHDKHPA_00560	HJNBOCI_00279	FHOIABA_00595
120	group_247	HAGPAKMC_00602	LLKGNJGC_00573	PFLBLGD_00686	MEHDKHPA_00669	HJNBOCI_00388	FHOIABA_00703
121	rplV	HAGPAKMC_00614	LLKGNJGC_00561	PFLBLGD_00698	MEHDKHPA_00681	HJNBOCI_00400	FHOIABA_00715
122	yfiC	HAGPAKMC_00245	LLKGNJGC_00152	PFLBLGD_00333	MEHDKHPA_00329	HJNBOCI_00049	FHOIABA_00348
123	ycfH	HAGPAKMC_00301	LLKGNJGC_00096	PFLBLGD_00397	MEHDKHPA_00382	HJNBOCI_00101	FHOIABA_00412
124	rplL	HAGPAKMC_00360	LLKGNJGC_00037	PFLBLGD_00456	MEHDKHPA_00441	HJNBOCI_00160	FHOIABA_00471
125	group_31	HAGPAKMC_00375	LLKGNJGC_00022	PFLBLGD_00472	MEHDKHPA_00456	HJNBOCI_00175	FHOIABA_00486
126	group_34	HAGPAKMC_00506	LLKGNJGC_00667	PFLBLGD_00595	MEHDKHPA_00577	HJNBOCI_00296	FHOIABA_00611
127	group_35	HAGPAKMC_00543	LLKGNJGC_00632	PFLBLGD_00630	MEHDKHPA_00613	HJNBOCI_00332	FHOIABA_00648
128	rpmH	HAGPAKMC_00577	LLKGNJGC_00598	PFLBLGD_00661	MEHDKHPA_00644	HJNBOCI_00363	FHOIABA_00678
129	gpsA	HAGPAKMC_00630	LLKGNJGC_00545	PFLBLGD_00714	MEHDKHPA_00697	HJNBOCI_00416	FHOIABA_00731
130	ybaB	HAGPAKMC_00729	LLKGNJGC_00432	PFLBLGD_00060	MEHDKHPA_00062	HJNBOCI_00529	FHOIABA_00060
131	group_10	HAGPAKMC_00645	LLKGNJGC_00530		MEHDKHPA_00715	HJNBOCI_00434	FHOIABA_00746
132	group_65	HAGPAKMC_00396	LLKGNJGC_00003	PFLBLGD_00495	MEHDKHPA_00480	HJNBOCI_00199	FHOIABA_00214
133	group_8	HAGPAKMC_00663	LLKGNJGC_00514		MEHDKHPA_00729	HJNBOCI_00447	FHOIABA_00761
134	group_81		LLKGNJGC_00279	PFLBLGD_00205	MEHDKHPA_00221	HJNBOCI_00685	FHOIABA_00214
135	Gene	A4	CP034544	MS53	MS_H	NZ_CP012624	TYPE
136	ulaB_2	HAGPAKMC_00669	LLKGNJGC_00504	PFLBLGD_00744			FHOIABA_00772
137	group_2	HAGPAKMC_00599	LLKGNJGC_00709	PFLBLGD_00496			FHOIABA_00576
138	group_32	HAGPAKMC_00417	LLKGNJGC_00746	PFLBLGD_00518			FHOIABA_00530
139	group_40		LLKGNJGC_00193	PFLBLGD_00301	MEHDKHPA_00289	HJNBOCI_00009	
140	fusA_1		LLKGNJGC_00446	PFLBLGD_00045	MEHDKHPA_00048	HJNBOCI_00515	
141	group_88		LLKGNJGC_00765	PFLBLGD_00499	MEHDKHPA_00483	HJNBOCI_00202	
142	group_11	HAGPAKMC_00258	LLKGNJGC_00138	PFLBLGD_00320			
143	group_111				MEHDKHPA_00339	HJNBOCI_00059	FHOIABA_00337
144	group_26	HAGPAKMC_00206			MEHDKHPA_00629	HJNBOCI_00348	
145	group_27	HAGPAKMC_00217		PFLBLGD_00315			FHOIABA_00329
146	deoC	HAGPAKMC_00427			MEHDKHPA_00342	HJNBOCI_00062	
147	group_38	HAGPAKMC_00658	LLKGNJGC_00518				FHOIABA_00759
148	group_4		LLKGNJGC_00745		MEHDKHPA_00501	HJNBOCI_00220	
149	group_41		LLKGNJGC_00312		MEHDKHPA_00183	HJNBOCI_00650	
150	nanA_1		LLKGNJGC_00466		MEHDKHPA_00030	HJNBOCI_00497	
151	group_49				MEHDKHPA_00318	HJNBOCI_00038	FHOIABA_00360
152	dprM	HAGPAKMC_00135			MEHDKHPA_00210	HJNBOCI_00674	
153	group_73		LLKGNJGC_00139	PFLBLGD_00321			FHOIABA_00335
154	group_1	HAGPAKMC_00263	LLKGNJGC_00135				

<그림 10> 야외주와 백신주 구별가능한 특이유전자 후보군 확인

Nucleotide BLAST

- MS 야외분리주와 백신주를 구별 가능한 특이유전자 후보군을 선정하여 NCBI database에 기반한 BLAST search 수행

- 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별가능한 특이유전자 선정 : ulaB_2 <그림 11.1>, ulaC_2 <그림 11.2>.



<그림 11.1> 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별가능한 특이유전자 선정 : ulaB_2



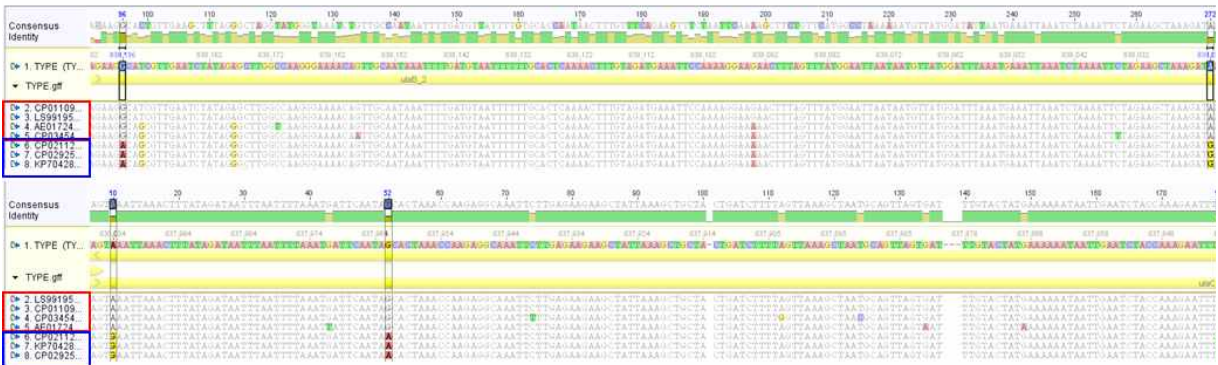
<그림 11.2> 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별가능한 특이유전자 선정 : ulaC_2

야외주 특이유전자 또는 SNP 발굴

(1) MS 야외주 특이유전자 또는 SNP 부위 중 특이적 검출이 가능한 후보 Region 선정

- MS 야외분리주 특이유전자 및 SNP 부위 확보
- ulaB_2, ulaC_2 유전자 위치에 SNP 부위 다수 확보<그림 10.>
- A. ulaB_2 G96A
- B. ulaB_2 A272G
- C. ulaC_2 A10G
- D. ulaC_2 G52A
- E. ulaC_2 G179T

■ 야외주
■ 백신주



<그림 12> ulaB_2, ulaC_2 유전자 위치에 SNP 부위 다수 확보

3-2. 감별 가능한 특이유전자 또는 SNP 부위를 적용한 진단법 개발

(1) Conventional PCR 진단법 개발

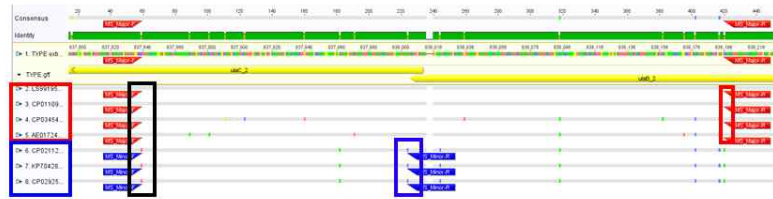
- 1) 유전자 증폭기법 기반 MS 야외주 특이적 프라이머 제작 <표 9>.

<표 13> 유전자 증폭기법 기반 MS야외주 및 백신주 특이적 프라이머 제작 (Conventional PCR)

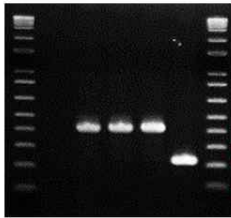
-	Name	Sequence
야외주 409 bp	MS-Wild_cPCR_409bp-F	ATCAGCTATTACGTAATAAGGCC
	MS-Wild_cPCR_409bp-R	CAAGCTTTAAAAGAATTAAATTTAGAAGG
백신주 214 bp	MS-Vaccine_cPCR_214bp-F	ATCAGCTATTACGTAATAAGGCCA
	MS-Vaccine_cPCR_214bp-R	GCTAAAGATGAACTTAATGCTTAGTG

2) MS 야외주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작 <그림 11>

야외주 409 bp
백신주 214 bp



a) MS 야외주 및 백신주 유전자 특이적 프라이머 디자인



M N 1 2 3 4

M : 1 kb DNA Size marker
N : No template Control
1 : 야외주 A4
2 : 야외주 CM2M3C3
3 : 야외주 BS4S4
4 : 백신주 MS_H

50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	35
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	1

c) Conventional PCR Condition

b) MS 야외주 및 백신주 유전자 특이적 검출 시스템 Conventional PCR 결과

<그림 13> MS 야외주 및 백신주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작

3) 분석적 성능평가 수행

A. 특이도 시험_확보한 DNA 시료를 이용하여 검출 목표가 아닌 핵산에서는 증폭반응이 일어나지 않는 것을 목표로 함 <그림 12>

- DNA 시료 중 MS 야외주 9개, MS 백신주 2개를 포함한 총 49 종류를 검사한 결과, 야외주 9개, 백신주 2개에서만 특이적으로 검출.

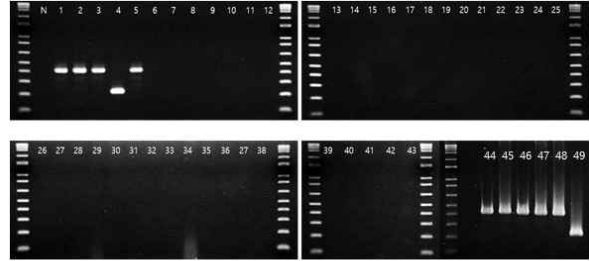
- 기타 38 종류의 병원체 시료 (Bacteria, Virus, Animal)에서는 모두 증폭반응이 일어나지 않음.

■ MS 야외주 유전자 검출
■ MS 백신주 유전자 검출

Category	No.	Name	Strain No.	야외주	백신주
Bacteria/ Virus	1	<i>Mycoplasma synoviae</i> 야외주 1	건국대 제공		-
	2	<i>Mycoplasma synoviae</i> 야외주 2	건국대 제공		-
	3	<i>Mycoplasma synoviae</i> 야외주 3	건국대 제공		-
	4	<i>Mycoplasma synoviae</i> 백신주	건국대 제공	-	
	5	<i>Mycoplasma synoviae</i>	KVCC-BA0702556		-
	6	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	KVCC-BA1200149	-	-
	7	Avian influenza H5	건국대 제공	-	-
	8	Avian influenza H7	건국대 제공	-	-
	9	Avian influenza H9	건국대 제공	-	-
	10	Newcastle disease virus	건국대 제공	-	-
	11	Infectious bronchitis virus	건국대 제공	-	-
	12	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-
	13	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	-	-
	14	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-
	15	<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 33250	-	-
	16	<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 8326	-	-
	17	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 29629	-	-
	18	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	ATCC 43971	-	-
	19	<i>Salmonella enterica subsp. anzonae</i>	KCTC 12398	-	-
	20	<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 12397	-	-
	21	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-
	22	<i>Shigella boydii</i>	KCTC 22528	-	-
	23	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12916	-	-
	24	<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 10084	-	-
	25	<i>E. coli</i>	ATCC 43888	-	-
	26	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-
	27	<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-
	28	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-
	29	<i>Legionella birminghamsensis</i>	KCTC 12007	-	-
	30	<i>Legionella israelensis</i>	KCTC 12008	-	-
	31	<i>Legionella busanensis</i>	KCTC 12084	-	-
	32	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 10380	-	-
	33	<i>Enterococcus spp.</i>	KVCC-BA0500611	-	-
	34	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KVCC-BA1100204	-	-

Category	No.	Name	Strain No.	야외주	백신주
Animal gDNA	35	Human	-	-	-
	36	Cow	-	-	-
	37	Pig	-	-	-
	38	Chicken	-	-	-
	39	Duck	-	-	-
	40	Goat	-	-	-
	41	Sheep	-	-	-
	42	Turkey	-	-	-
	43	Horse	-	-	-

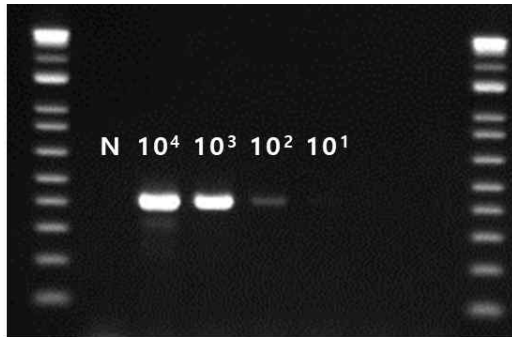
Category	No.	Name	Strain no.	야외주	백신주
MS (추가 검사 시료)	44	<i>Mycoplasma synoviae</i> 1	건국대 제공		-
	45	<i>Mycoplasma synoviae</i> 2	건국대 제공		-
	46	<i>Mycoplasma synoviae</i> 3	건국대 제공		-
	47	<i>Mycoplasma synoviae</i> 4	건국대 제공		-
	48	<i>Mycoplasma synoviae</i> 5	건국대 제공		-
	49	<i>Mycoplasma synoviae</i> 6	건국대 제공	-	



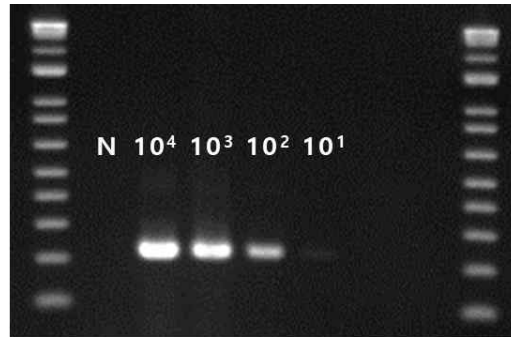
<그림 14> 분석적 성능평가_특이도 시험 (Conventional PCR)

B. 민감도 시험_최저 검출한계를 측정하여 $10^2 \sim 10^1$ copies/ μ L를 목표로 함 <그림 13>.

- 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10^2 copies/ μ L 까지 검출되는 것을 확인.
- 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10^2 copies/ μ L 까지 검출되는 것을 확인.



a) 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10^2 Copies/ μ L 까지 검출되는 것을 확인.



b) 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10^2 Copies/ μ L 까지 검출되는 것을 확인.

<그림 15> 분석적 성능평가_민감도 시험 (Conventional PCR)

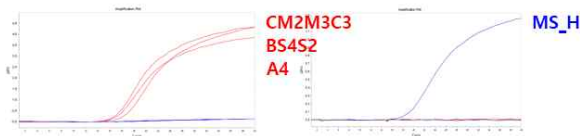
(1) Real-time PCR 진단법 개발

- 1) 실시간 유전자 증폭기법 기반 MS 야외주 특이적 프라이머 및 프로브 제작 <표 10>.

<표 14> 실시간 유전자 증폭기법 기반 MS 야외주 및 백신주 특이적 프라이머, 프로브 제작

Name	Sequence
MS-qPCR-F1	AATTTGCCTCTTGGTTTAGTGC
MS-qPCR-F2	GAATTTGCCTCTTGGTTTAGTGT
MS-qPCR-R1	TGAAATTAATCTAAAATTCTAGAAGCTA
MS-qPCR-R2	TGAAATTAATCTAAAATTTTAGAAGCTA
MS-Wild-qPCR-FAM1	AGATAAACTTAATGCTTAGTAAAT
MS-Wild-qPCR-FAM2	AAATAAACTTAATGCTTAGTAAATT
MS-Vaccine-qPCR-VIC	GATGAACTTAATGCTTAGTGAAT

2) MS 야외주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작 <그림 14>.



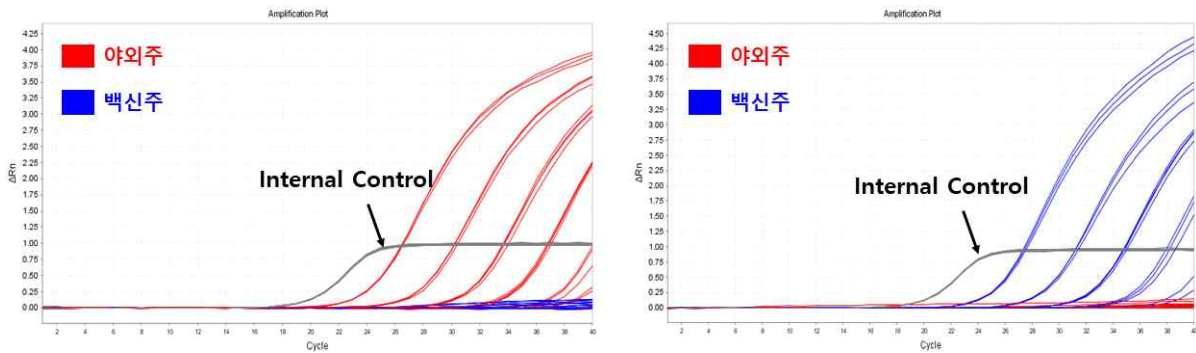
Fluorophore	Target
FAM	Wild strain (야외주)
VIC	Vaccinated strain (백신주)
Cy5	Internal Control

50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	
60 °C	1 min	40

c) Real-time PCR condition

<그림 16> MS 야외주 및 백신주 실시간 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작

3) Real-time PCR 반응의 유효성을 확인할 수 있는 internal control 첨가
 - MS 야외주 프로브 (FAM), 백신주 프로브 (VIC) 및 Internal control 프로브 (Cy5)를 첨가하여 Real-time PCR 반응의 유효성 확인 완료. <그림 15>.



<그림 17> Real-time PCR 반응의 유효성을 확인할 수 있는 internal control 첨가

4) 분석적 성능평가 수행

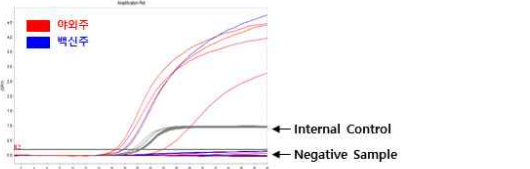
A. 특이도 시험_확보한 DNA 시료를 이용하여 검출 목표가 아닌 핵산에서는 증폭반응이 일어나지 않는 것을 목표로 함 <그림 16>.

- DNA 시료 중 MS 야외주 9개, MS 백신주 2개를 포함한 총 49 종류를 검사한 결과, 야외주 9개, 백신주 2개에서만 특이적으로 검출.

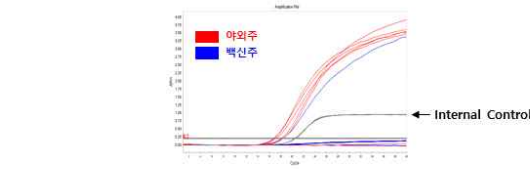
- 기타 38 종류의 병원체 시료 (Bacteria, Virus, Animal)에서는 모두 증폭반응이 일어나지 않음.

Category	Name	Strain No.	MS 야외주 유전자 검출			MS 백신주 유전자 검출			
			FAM	VIC	Cy5	FAM	VIC	Cy5	
Virus	Avian Influenza H5		-	-	+	-	-	-	
	Avian Influenza H7		-	-	+	-	-	-	
	Avian Influenza H9		-	-	+	-	-	-	
	Newcastle disease virus		-	-	+	-	-	-	
	Infectious bronchitis virus		-	-	+	-	-	-	
	Human		-	-	+	-	-	-	
Animal gDNA	Cow		-	-	+	-	-	-	
	Pig		-	-	+	-	-	-	
	Chicken		-	-	+	-	-	-	
	Duck		-	-	+	-	-	-	
	Goat		-	-	+	-	-	-	
	Sheep		-	-	+	-	-	-	
	Turkey		-	-	+	-	-	-	
	Horse		-	-	+	-	-	-	
	Bacteria	<i>Mycoplasma synoviae</i>	KVCC-BA0702556	+	-	+	-	-	+
		<i>Mycoplasma synoviae</i> CM2M3C3	전국대 제공	+	-	+	-	-	+
<i>Mycoplasma synoviae</i> BS452		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> A4		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> MS_H		전국대 제공	-	+	-	-	+	-	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 1		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 2		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 3		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 4		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 5		전국대 제공	+	-	+	-	-	+	
<i>Mycoplasma synoviae</i> 6		전국대 제공	-	+	-	-	+	-	
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>		KVCC-BA1200149	-	-	-	-	-	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 13585	-	-	-	-	-	+	
<i>Campylobacter jejuni</i>		ATCC 33250	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella Dublin</i>		ATCC 33250	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella Heidelberg</i>		ATCC 8326	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella typhimurium</i>		ATCC 29629	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella enterica subsp. Enterica</i>		ATCC 43971	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella enterica subsp. Arizonae</i>		KCTC 12398	-	-	-	-	-	+	
<i>Salmonella bongori</i>		KCTC 12397	-	-	-	-	-	+	
<i>Shigella flexneri</i>		ATCC 12022	-	-	-	-	-	+	
<i>Shigella boydii</i>		KCTC 22528	-	-	-	-	-	+	
<i>Clostridium perfringens</i>		ATCC 119916	-	-	-	-	-	+	
<i>Bacillus cereus</i>		NCCP 10084	-	-	-	-	-	+	
<i>E. Coli</i>		ATCC 43888	-	-	-	-	-	+	
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC 19113	-	-	-	-	-	+	
<i>Yersinia enterocolitica</i>		KCCM 41657	-	-	-	-	-	+	
<i>Vibrio vulnificus</i>		ATCC 27562	-	-	-	-	-	+	
<i>Legionella birminghamensis</i>		KCTC 12007	-	-	-	-	-	+	
<i>Legionella israelensis</i>		KCTC 12008	-	-	-	-	-	+	
<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i>		KCTC 12084	-	-	-	-	-	+	
<i>Bordetella pertussis</i>		ATCC 10380	-	-	-	-	-	+	
<i>Enterococcus</i> spp.		KVCC-BA0500611	-	-	-	-	-	+	
<i>Riemerella anatipestifer</i>		KVCC-BA1100204	-	-	-	-	-	+	

Category	Name	Strain No.	야외주	백신주	IC
			FAM	VIC	Cy5
Virus	Avian Influenza H5		-	-	+
	Avian Influenza H7		-	-	+
	Avian Influenza H9		-	-	+
	Newcastle disease virus		-	-	+
	Infectious bronchitis virus		-	-	+
	Human		-	-	+
Animal gDNA	Cow		-	-	+
	Pig		-	-	+
	Chicken		-	-	+
	Duck		-	-	+
	Goat		-	-	+
	Sheep		-	-	+
	Turkey		-	-	+
	Horse		-	-	+



a) 특이도 시험_야외주 및 백신주 시료에서만 특이적으로 검출되는 것을 확인.

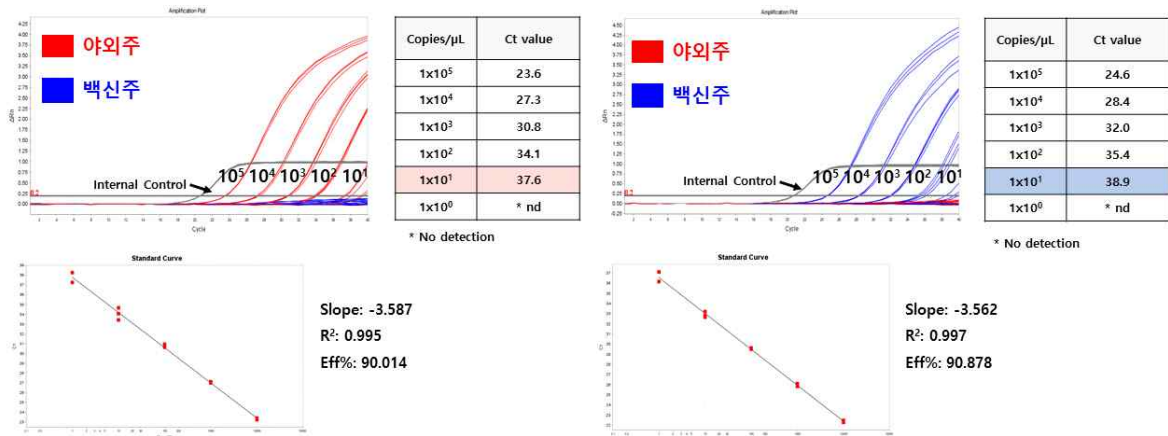


b) 특이도 시험_야외주 및 백신주 추가 시료 검사 (전국대학교 제공)

<그림 18> 분석적 성능평가_특이도 시험 (Real-time PCR)

B. 민감도 시험_최저 검출한계 (LoD)를 측정하여 10²~10¹ copies/μL 를 목표로 함. <그림 17>.

- 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.
- 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.



a) 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ Copies/μL 까지 검출되는 것을 확인. b) 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ Copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.
 <그림 19> Real-time PCR의 민감도 시험

C. 정밀도 시험_시험법의 정밀성을 변동계수 (Coefficient of variation, CV)로 평가하며, 5% 미만을 허용범위로 설정함.

- 도출된 LoD 값을 바탕으로 5 LoD, 3LoD, LoD 값으로 DNA를 희석하여 동일 실험자가 Real-time PCR을 반복수행하여 정밀도를 분석하였음.

- 야외주 : 20일간 Real-time PCR을 통해 정밀도 분석을 수행한 결과, CV값이 5 % 이내로 재현성이 있는 결과를 확인함.

- 야외주 정밀도 시험 결과 <그림 18>.
- 백신주 정밀도 시험 결과 <그림 19>.

Genomic DNA	Concentration (Copies/μL)		
	5x LoD	3x LoD	1x LoD
야외주	50	30	10

야외주			
Day	5x LoD	3x LoD	LoD
1	35.76	36.77	37.01
2	35.00	36.05	36.78
3	35.39	35.84	37.83
4	35.01	36.87	36.63
5	35.02	36.34	37.03
6	34.73	36.54	37.85
7	35.92	36.67	37.67
8	35.29	36.67	37.48
9	34.58	35.74	37.70
10	34.91	36.65	37.46
11	35.07	36.29	37.00
12	35.09	36.4	37.37
13	34.67	36.94	37.52
14	34.86	35.72	37.70
15	35.41	37.28	36.83
16	35.09	36.24	38.12
17	35.29	36.35	37.40
18	35.16	36.65	37.71
19	34.57	36.68	37.37
20	35.30	36.71	37.40
Ct mean	35.106	36.470	37.393
SD	0.355	0.408	0.399
CV (%)	1.01	1.12	1.07

Target	Conc.	Ct Mean	SD	CV(%)
Wild strain	5x LoD	35.106	0.355	1.01
	3x LoD	36.470	0.408	1.12
	1x LoD	37.393	0.399	1.07

<그림 20> Real time PCR 정밀도 시험 - 야외주

Genomic DNA	Concentration (Copies/ μ L)		
	5x LoD	3x LoD	1x LoD
백신주	50	30	10

백신주			
Day	5x LoD	3x LoD	LoD
1	36.37	38.02	38.2
2	37.64	37.73	38.19
3	36.73	37.32	39.45
4	35.94	37.26	37.88
5	36.81	36.46	39.78
6	36.07	37.04	38.06
7	37.08	37.81	38.63
8	35.67	36.87	39.67
9	36.90	37.33	38.63
10	37.05	37.49	38.17
11	36.66	37.66	39.66
12	37.09	37.43	38.37
13	36.14	37.52	39.51
14	36.4	37.85	39.34
15	36.28	37.49	37.98
16	36.59	38.02	38.19
17	36.44	37.33	38.37
18	36.92	37.73	38.71
19	36.90	37.32	38.59
20	36.64	38.02	38.02
Ct mean	36.616	37.485	38.670
SD	0.465	0.400	0.649
CV (%)	1.27	1.07	1.68

Target	Conc.	Ct Mean	SD	CV(%)
Vaccinated strain	5x LoD	36.616	0.465	1.27
	3x LoD	37.485	0.400	1.07
	1x LoD	38.670	0.649	1.68

<그림 21> Real-time PCR 정밀도 시험 - 백신주

4. 마이코플라스마 갈리셉티쿰(MG) 자연감염축과 예방접종축 감별 진단법 개발

4-1. 국내 닭 마이코플라스마 병(MG) 야외분리주의 전장유전체와 백신주의 전장유전체 비교분석

(1) Sequence alignment

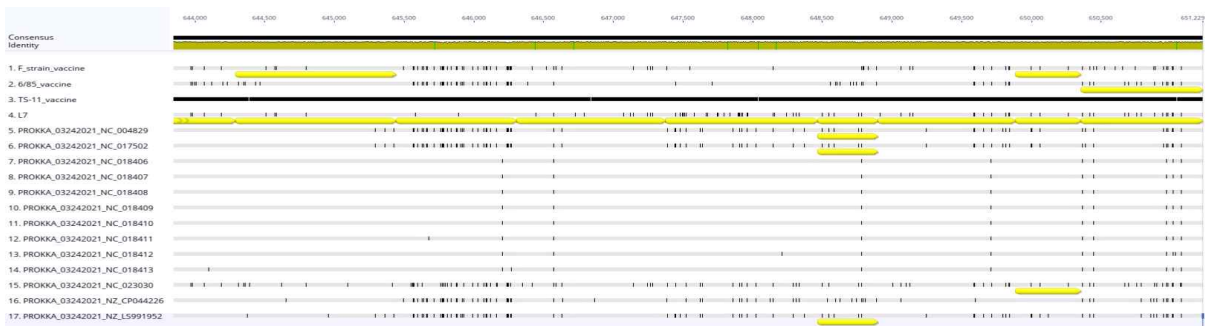
- 전장유전체 비교분석을 위해 NCBI에 존재하는 MG 19주를 추가로 이용하였음 <표 15>.

<표 15> 사용한 NCBI MG 야외주 및 백신주

Strain	Genbank
백신주 (F)	CP001873
백신주 (F)	CP028146
백신주 (F)	CP028147
백신주 (ts-11)	CP044225
백신주 (6/85)	CP044224
야외주	AE015450
야외주	CP001872
야외주	CP003506
야외주	CP003507
야외주	CP003508
야외주	CP003509
야외주	CP003510
야외주	CP003511
야외주	CP003512
야외주	CP003513
야외주	CP006916
야외주	CP044226
야외주	CP070622
야외주	LS991952

- 야외주 특이 유전자 또는 SNP 발굴을 위해 17주의 MG 전장유전체를 이용하여 core genome analysis 를 진행하였음.

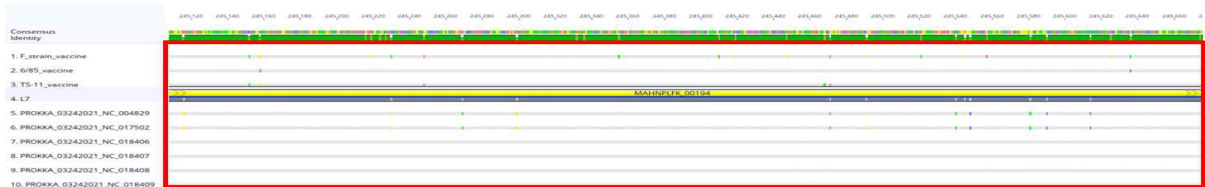
- Core_genome Alignment 분석 결과 약 651,228bp 유전자 확보 및 특이 유전자 후보군 설정 <그림 22>.



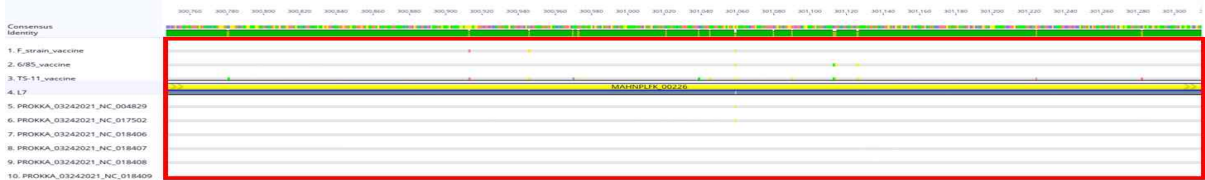
<그림 22> Core_genome Alignment 분석 결과 651,228 bp 유전자 확보.

(2) Nucleotide BLAST

- MG 야외분리주와 백신주를 구별 가능한 특이유전자 후보군을 선정하여 NCBI database에 기반한 BLAST search 수행
- 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별가능한 타겟 유전자 영역 선정 : MAHNPLFK_00194 <그림 23.1>, MAHNPLFK_00226 <그림 23.2>.



<그림 23.1 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별 가능한 타겟 유전자 부위 선정 : MAHNPLFK_00194>

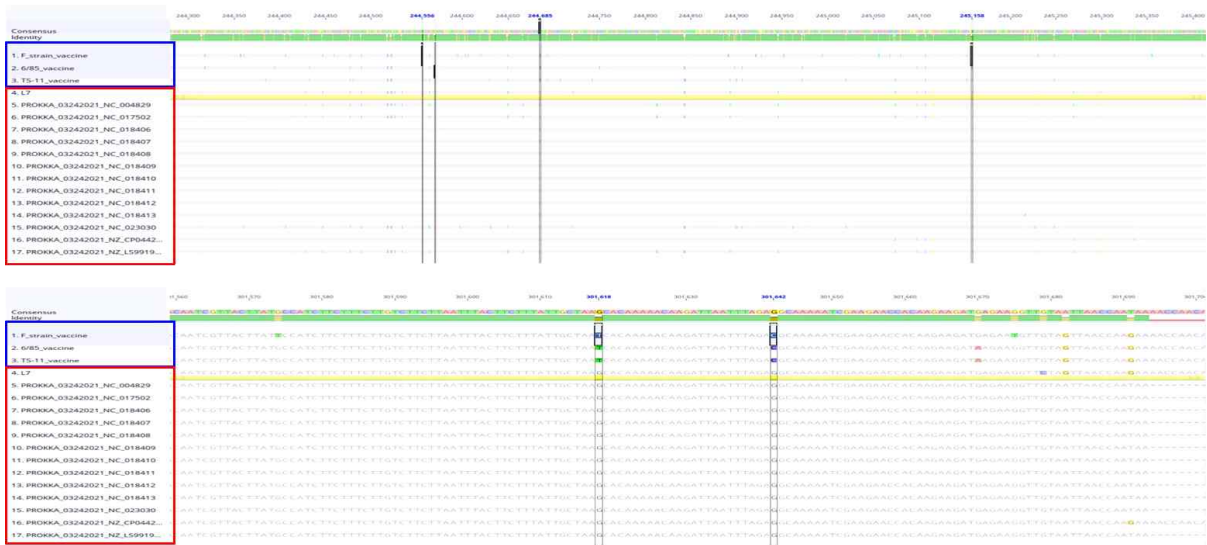


<그림 23.2 확보된 유전체 중 야외주와 백신주를 구별 가능한 타겟 유전자 부위 선정 : MAHNPLFK_00226>

4-2. 야외주 특이유전자 또는 SNP 발굴

(1) MG 야외주 특이유전자 또는 SNP 부위 중 특이적 검출이 가능한 후보 Region 선정

- MG 야외분리주 특이유전자 및 SNP 부위 확보
 - MAHNPLFK_00194, MAHNPLFK_00226 유전자 위치에 SNP 부위 다수 확보<그림 24>
- MAHNPLFK_00194 C553T
 - MAHNPLFK_00194 C657G
 - MAHNPLFK_00194 A682G
 - MAHNPLFK_00194 A or G1155C
 - MAHNPLFK_00226 T1318G
 - MAHNPLFK_00226 C1342G



<그림 24> MAHNPLFK_00194, MAHNPLFK_00226 유전자 위치에 SNP 부위 다수 확보

4-3. 감별 가능한 특이유전자 또는 SNP 부위를 적용한 진단법 개발

(1) Conventional PCR 진단법 개발

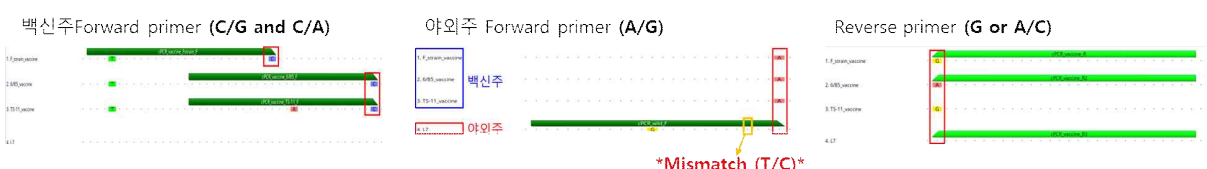
1) 유전자 증폭기법 기반 MG 야외주 특이적 프라이머 제작 <표 16>.

- 프라이머의 특이도 향상을 위해 3' 말단으로부터 4bp 떨어진 염기서열을 임의로 치환하여 프라이머를 제작하였음.

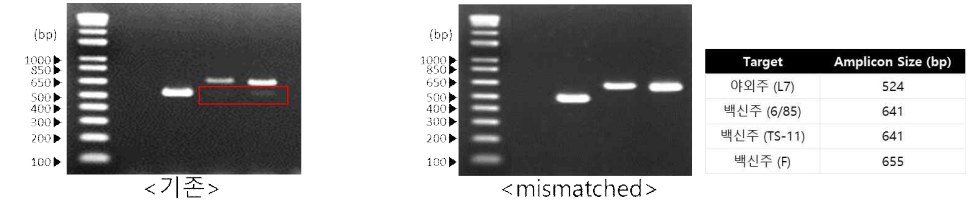
<표 16> 유전자 증폭기법 기반 MG 야외주 및 백신주 특이적 프라이머 제작 (Conventional PCR)

Name	Sequence
MG_cPCR_F_1	CTGATTTAACAGAAAACCTATTCGG
MG_cPCR_F_2	CTGACTTAACACAAAACCTATTCGG
MG_cPCR_F_3	GGATCAGTTACTTAGTTTTCAACAAC
MG_cPCR_F_4	GTTTTCAACAATTAGCAACTGATCTC
MG_cPCR_F_5	GTTTTCAACAATTAACAACCTGATCTC
MG_cPCR_R_1	TTGATTAGGATTATCCGTATTATTTAAG
MG_cPCR_R_2	TTGATTAGGATTATCCGTATTATTTAAC
MG_cPCR_R_3	CTTGATTAGGATTATCCGTATTATTTAAT

2) MG 야외주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작 <그림 25>.



a) MG 야외주 및 백신주 유전자 특이적 프라이머 디자인



b) MG cPCR system의 특이도 향상을 위해 mismatch 프라이머 디자인

<그림 25> MG 야외주 및 백신주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작

3) 분석적 성능평가 수행

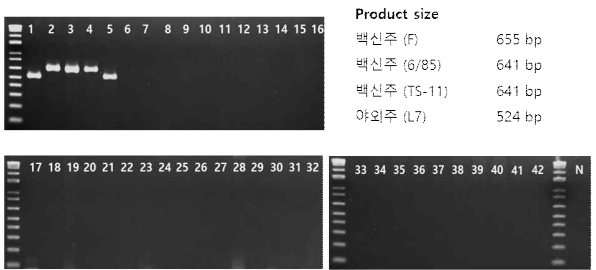
A. 특이도 시험_확보한 DNA 시료를 이용하여 검출 목표가 아닌 핵산에서는 증폭 반응이 일어나지 않는 것을 목표로 함 <그림 26>.

- DNA 시료 중 MG 야외주 2개, MG 백신주 3개를 포함한 총 42 종류를 검사한 결과, 야외주 2개, 백신주 3개에서만 특이적으로 검출.
- 기타 37 종류의 병원체 시료 (Bacteria, Virus, Animal)에서는 모두 증폭 반응이 일어나지 않음.

■ MG 야외주 유전자 검출
■ MG 백신주 유전자 검출

Category	No.	Name	Strain No.	야외주 FAM	백신주 VIC
Bacteria	1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> wild type	한국대 재종	+	-
	2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> vaccine (F)	한국대 재종	-	+
	3	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> vaccine (ts-11)	한국대 재종	-	+
	4	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> vaccine (6/85)	한국대 재종	-	+
	5	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	KVCC BA7200149	+	-
	6	<i>Mycoplasma synoviae</i>	KVCC BA2132556	-	-
	7	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12228	-	-
	8	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33295	-	-
	9	<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 33556	-	-
	10	<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 9326	-	-
	11	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 29816	-	-
	12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	ATCC 49571	-	-
	13	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Anatum</i>	KCTC 12308	-	-
	14	<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 12307	-	-
	15	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 10722	-	-
	16	<i>Shigella boydii</i>	KCTC 23328	-	-
	17	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12131E	-	-
	18	<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 16984	-	-
	19	<i>E. coli</i>	ATCC 43988	-	-
	20	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-
	21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-
	22	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27957	-	-
	23	<i>Legionella pneumophila</i>	KCTC 12007	-	-
	24	<i>Legionella pneumophila</i>	KCTC 13008	-	-
	25	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i>	KCTC 12054	-	-
	26	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 10980	-	-
	27	<i>Enterobacter spp.</i>	KVCC BA7200611	-	-
	28	<i>Blattariella anatisensifer</i>	KVCC BA1130034	-	-
	29	Human influenza H5	충청대리본부 불일	-	-
	30	Human influenza H7	충청대리본부 불일	-	-
	31	Human influenza H9	충청대리본부 불일	-	-
	32	Newcastle disease virus	한국대 재종	-	-
	33	Infectious bursal disease virus	한국대 재종	-	-

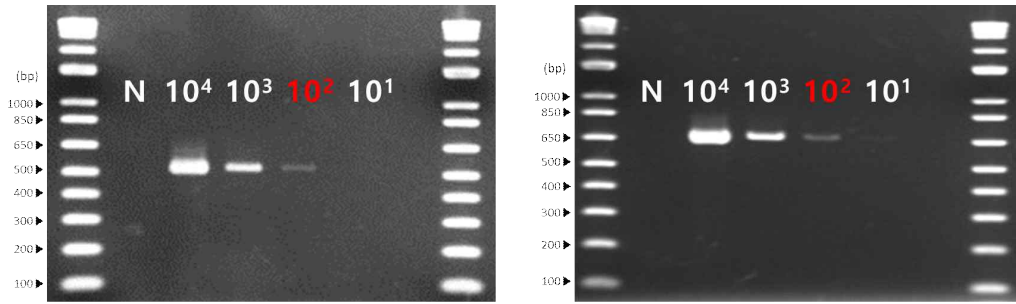
Category	No.	Name	Strain No.	야외주 FAM	백신주 VIC
Animal gDNA	34	Human		-	-
	35	Cow		-	-
	36	Pig		-	-
	37	Chicken		-	-
	38	Nucle		-	-
	39	Goat		-	-
	40	Sheep		-	-
	41	Turkey		-	-
	42	Horse		-	-



<그림 26> 분석적 성능평가_특이도 시험 (Conventional PCR)

B. 민감도 시험_최저 검출한계를 측정하여 10²~10¹ copies/μL를 목표로 함 <그림 27>.

- 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10² copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.
- 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10² copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.



a) 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10² CCU/μL 까지 검출되는 것을 확인. b) 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10² CCU/μL 까지 검출되는 것을 확인.
 <그림 27> 분석적 성능평가_민감도 시험 (Conventional PCR)

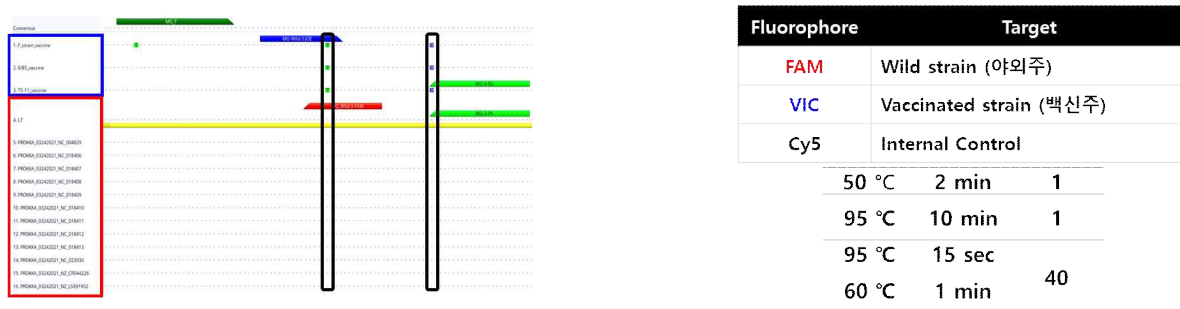
(1) Real-time PCR 진단법 개발

1) 실시간 유전자 증폭기법 기반 MG 야외주 특이적 프라이머 및 프로브 제작 <표 17>.

<표 17> 실시간 유전자 증폭기법 기반 MG 야외주 및 백신주 특이적 프라이머, 프로브 제작

Name	Sequence
MG-qPCR-F	TTATGCCATCTTCTTTCTTGTCTTCTT
MG-qPCR-R1	CTTGTGGTTCTTCGATTTTGCC
MG-qPCR-R2	CTTGTGGTTCTTCGATTTTGCG
MG-Wild-qPCR-FAM	CTTGTTTTGTGCTTAGC
MG-Vaccine-qPCR-VIC	CTTCTTTATTGCTAATCAC

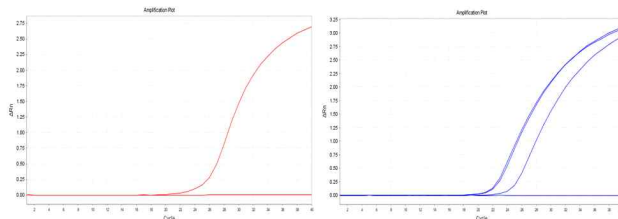
2) MG 야외주 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작 <그림 28>.



a) MG 야외주 및 백신주 유전자 특이적 프라이머, 프로브 디자인

b) Real-time PCR condition

■ 야외주
 ■ 백신주

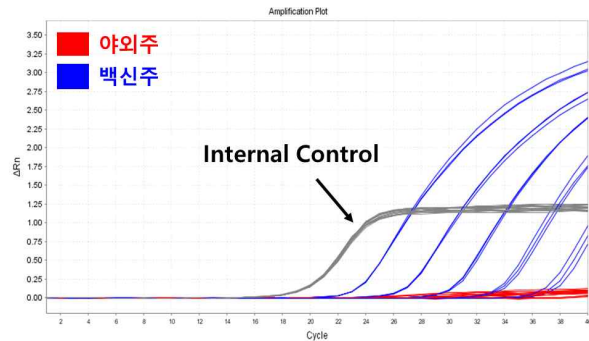
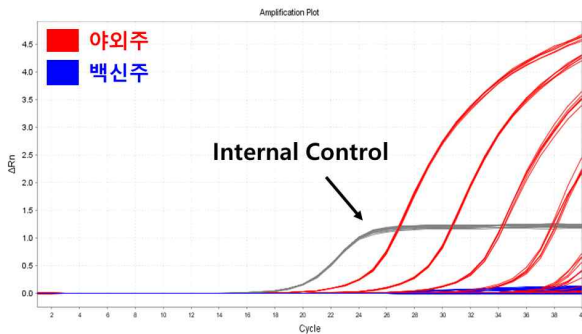


c) MG 야외주 및 백신주 유전자 특이적 검출 시스템 Real-time PCR 결과

<그림 28> MG 야외주 및 백신주 실시간 유전자 진단법 관련 Target에 대한 검출 시스템 제작

3) Real-time PCR 반응의 유효성을 확인할 수 있는 internal control 첨가

- MG 야외주 프로브 (FAM), 백신주 프로브 (VIC) 및 Internal control 프로브 (Cy5)를 첨가하여 Real-time PCR 반응의 유효성 확인 완료. <그림 29>.



<그림 29> Real-time PCR 반응의 유효성을 확인할 수 있는 internal control 첨가

4) 분석적 성능평가 수행

A. 특이도 시험_확보한 DNA 시료를 이용하여 검출 목표가 아닌 핵산에서는 증폭 반응이 일어나지 않는 것을 목표로 함 <그림 30>.

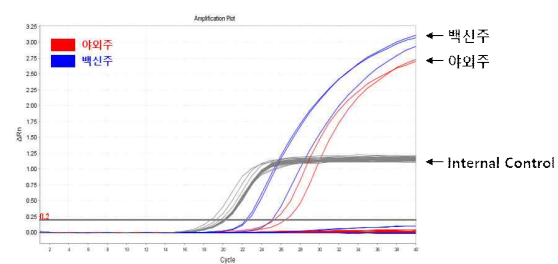
- DNA 시료 중 MG 야외주 2개, MS 백신주 3개를 포함한 총 42 종류를 검사한 결과, 야외주 2개, 백신주 3개에서만 특이적으로 검출.

- 기타 37 종류의 병원체 시료 (Bacteria, Virus, Animal)에서는 모두 증폭 반응이 일어나지 않음.

■ MG 야외주 유전자 검출
■ MG 백신주 유전자 검출

Category	No.	Name	Strain No.	야외주 FAM	백신주 VIC	IC CYS	
Bacteria	1	<i>Mycobacterium gallisepticum</i> wild type	한국대 재균	-	-	+	
	2	<i>Mycobacterium gallisepticum</i> vaccine (F)	한국대 재균	-	-	+	
	3	<i>Mycobacterium gallisepticum</i> vaccine (ts-11)	한국대 재균	-	-	+	
	4	<i>Mycobacterium gallisepticum</i> vaccine (6/85)	한국대 재균	-	-	+	
	5	<i>Mycobacterium gallisepticum</i>	KVCC-BA1200145	-	-	+	
	6	<i>Mycobacterium goodii</i>	KVCC-BA6702536	-	-	+	
	7	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13506	-	-	+	
	8	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33257	-	-	+	
	9	<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 43256	-	-	+	
	10	<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 8326	-	-	+	
	11	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 29629	-	-	+	
	12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	ATCC 43971	-	-	+	
	13	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	KCTC 13350	-	-	+	
	14	<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 13357	-	-	+	
	15	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12917	-	-	+	
	16	<i>Shigella boydii</i>	KCTC 22326	-	-	+	
	17	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12146	-	-	+	
	18	<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 13054	-	-	+	
	19	<i>E. Coli</i>	ATCC 43980	-	-	+	
	20	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-	+	
	21	<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	+	
	22	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-	+	
	23	<i>Legionella birninghamensis</i>	KCTC 12807	-	-	+	
	24	<i>Legionella israelensis</i>	KCTC 12908	-	-	+	
	25	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i>	KCTC 12904	-	-	+	
	26	<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 10240	-	-	+	
	27	<i>Enterobacter</i> spp.	KVCC-BA030611	-	-	+	
	28	<i>Klebsiella aerogenes</i>	KVCC-BA11007DM	-	-	+	
	Virus	29	avian influenza H5	질병관리본부 분양	-	-	+
		30	avian influenza H7	질병관리본부 분양	-	-	+
		31	avian influenza H9	질병관리본부 분양	-	-	+
		32	influenza virus	한국대 재균	-	-	+
		33	infectious bronchitis virus	한국대 재균	-	-	+

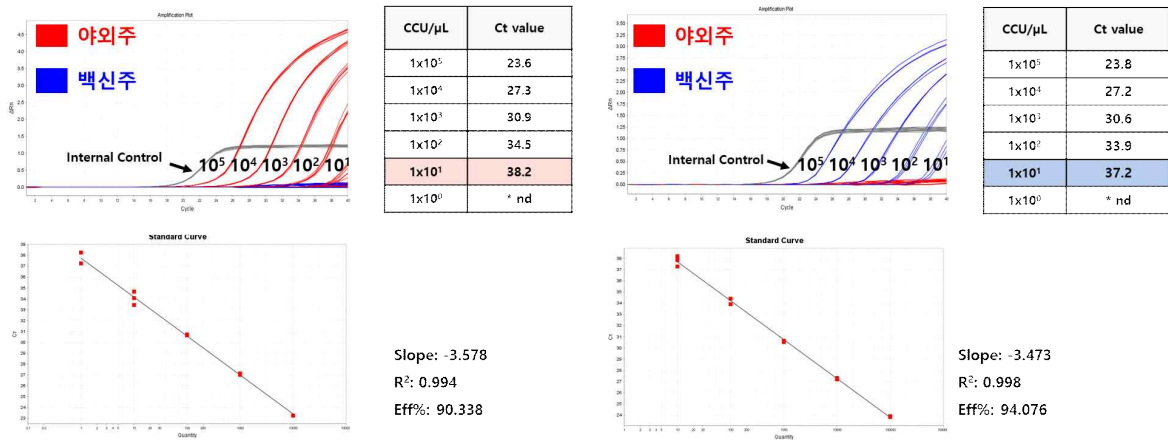
Category	No.	Name	Strain No.	야외주 FAM	백신주 VIC	IC CYS
Animal gDNA	34	Human	-	-	-	+
	35	Cow	-	-	-	+
	36	Pig	-	-	-	+
	37	Chicken	-	-	-	+
	38	Duck	-	-	-	+
	39	Goat	-	-	-	+
	40	Sheep	-	-	-	+
	41	Turkey	-	-	-	+
	42	Horse	-	-	-	+



<그림 30> 분석적 성능평가_특이도 시험 (Real-time PCR)

B. 민감도 시험_최저 검출한계 (LoD)를 측정하여 10²~10¹ copies/μL 를 목표로 함. <그림 31>.

- 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.
- 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ copies/μL 까지 검출되는 것을 확인.



a) 야외주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ CCU/μL 까지 검출되는 것을 확인. b) 백신주 DNA 시료의 민감도 시험 결과 10¹ CCU/μL 까지 검출되는 것을 확인.

<그림 31> Real-time PCR의 민감도 시험

C. 정밀도 시험_시험법의 정밀성을 변동계수 (Coefficient of variation, CV)로 평가하며, 5% 미만을 허용범위로 설정함.

- 도출된 LoD 값을 바탕으로 5 LoD, 3LoD, LoD 값으로 DNA를 희석하여 동일 실험자가 Real-time PCR을 반복수행하여 정밀도를 분석하였음.

- MG 야외주 : 20일간 Real-time PCR을 통해 정밀도 분석을 수행한 결과, CV값이 5 % 이내로 재현성이 있는 결과를 확인함.

- MG 야외주 정밀도 시험 결과 <그림 32>.

- MG 백신주 정밀도 시험 결과 <그림 33>.

야외주			
Day	5x LoD	3x LoD	LoD
1	33.80	34.62	36.71
2	34.30	35.07	37.21
3	34.40	35.53	37.35
4	34.80	35.33	37.66
5	34.48	35.17	37.27
6	34.73	35.39	37.45
7	34.54	35.26	37.01
8	34.31	35.02	36.89
9	34.13	34.48	37.22
10	34.11	35.00	37.17
11	35.02	35.10	38.05
12	35.01	34.83	37.60
13	34.99	34.95	37.52
14	34.76	34.82	37.51
15	34.70	34.90	36.91
16	34.40	34.71	37.19
17	33.96	34.35	36.98
18	34.66	34.61	37.02
19	34.84	34.50	36.76
20	34.80	34.30	36.74
Ct mean	34.54	34.90	37.21
SD	0.36	0.35	0.35
CV (%)	1.03	1.00	0.94

Genomic DNA	Concentration (copies/μL)		
	5x LoD	3x LoD	1x LoD
야외주	50	30	10

Target	Conc.	Ct Mean	SD	CV(%)
Wild strain	5x LoD	34.54	0.36	1.03
	3x LoD	34.90	0.35	1.00
	1x LoD	37.21	0.35	0.94

<그림 32> Real time PCR 정밀도 시험 - MG 야외주

백신주			
Day	5x LoD	3x LoD	LoD
1	34.18	35.55	37.45
2	34.62	35.49	37.29
3	34.56	35.51	36.69
4	34.25	35.17	37.30
5	34.21	35.08	37.55
6	34.35	35.17	36.69
7	34.41	34.62	37.23
8	34.09	35.44	36.74
9	34.29	34.95	37.85
10	34.31	35.39	36.91
11	34.39	35.68	37.11
12	34.82	35.42	37.22
13	34.38	35.29	36.70
14	34.29	35.24	37.07
15	34.08	35.64	36.61
16	34.46	35.26	37.45
17	34.54	35.58	37.03
18	34.63	35.49	36.98
19	34.38	35.41	37.63
20	34.88	35.03	37.10
Ct mean	34.41	35.32	37.15
SD	0.22	0.26	0.33
CV (%)	0.63	0.74	0.88

Genomic DNA	Concentration (copies/ μ L)		
	5x LoD	3x LoD	1x LoD
백신주	50	30	10

Target	Conc.	Ct Mean	SD	CV(%)
Vaccine strain	5x LoD	34.41	0.22	0.63
	3x LoD	35.32	0.26	0.74
	1x LoD	37.15	0.33	0.88

<그림 33> Real-time PCR 정밀도 시험 - MG 백신주

5. 닭 마이코플라스마병(MS, MG) 감별진단법의 야외 임상평가

5-1. 백신예방접종 농장과 자연감염 농장 시료를 이용한 감별 진단법 평가

○ 야외 효능평가를 위한 Test-bed 선정

- 신규 개발된 진단법의 농장시료 대상 실증을 통해 개발기술의 효용성 평가를 위해 위탁연구기관의 회원농가 중 MG/MS 발생이력, 백신이력 등을 고려하여 시험농가 선정함(5개소 이상)
- 육계, 산란계, 종계, 토종닭 등 총 5곳의 기관스왑 시료를 확보하여 항원검사를 수행함

① 마이코플라스마병 농장 샘플링 방법

㉠ 대상농가 : MG/MS 발생이력농가 및 백신이력 등 고려하여 5개소 이상 선정함

㉡ 샘플링 방법 : MG/MS 의심축 또는 백신접종 개체로부터 샘플채취함

- 샘플링 위치 및 방법 : 뒤콧구멍틈새(choanal cleft)와 기관에 면봉을 이용하여 swabbing <그림 34>



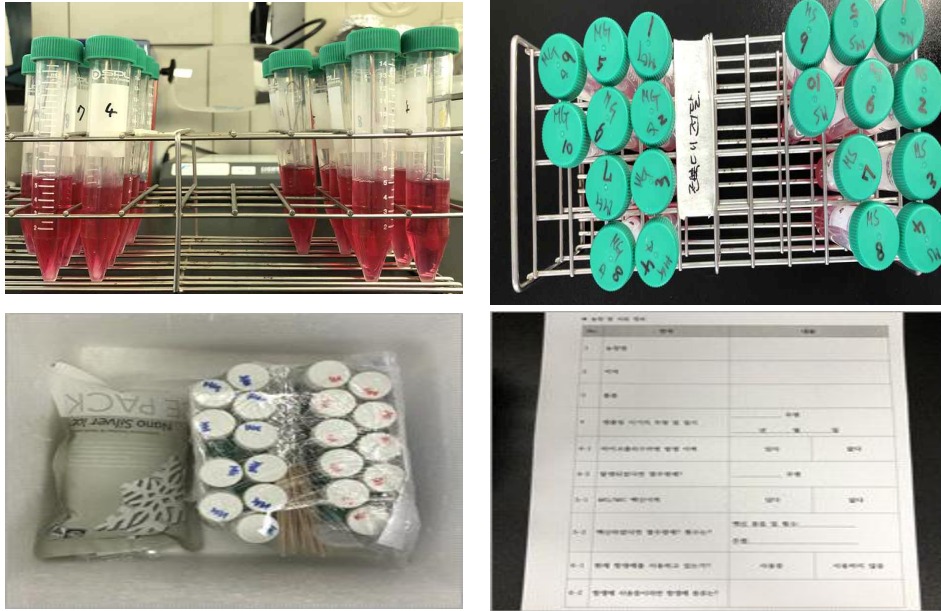
뒤콧구멍틈새



기관

<그림 34> 샘플링 부위

- 각 농장마다 의심축 최대 20마리를 확보하여 스왑시료는 MG배지와 MS배지에 넣음
- 냉장보관 상태(아이스팩)로 연구실로 수송함 <그림 35>



<그림 35> 시료 수송 방식

② 농장 및 시료 정보 <표 18>

No.	항목	내용	
1	농장명		
2	지역		
3	품종		
4	샘플링 시기의 주령	_____ 주령	
4-1	마이코플라스마병 발생 이력	있다	없다
4-2	발생되었다면 몇 주령에?	_____ 주령	
5-1	MG/MG 백신이력	있다	없다
5-2	백신하였다면 몇 주령에? 횡수는?	백신 종류 및 횡수: _____ 주령: _____	
6-1	현재 항생제를 사용하고 있는가?	사용중	사용하지 않음
6-2	항생제 사용중이라면 항생제 종류는?		

<표 18> 농장 및 시료 정보

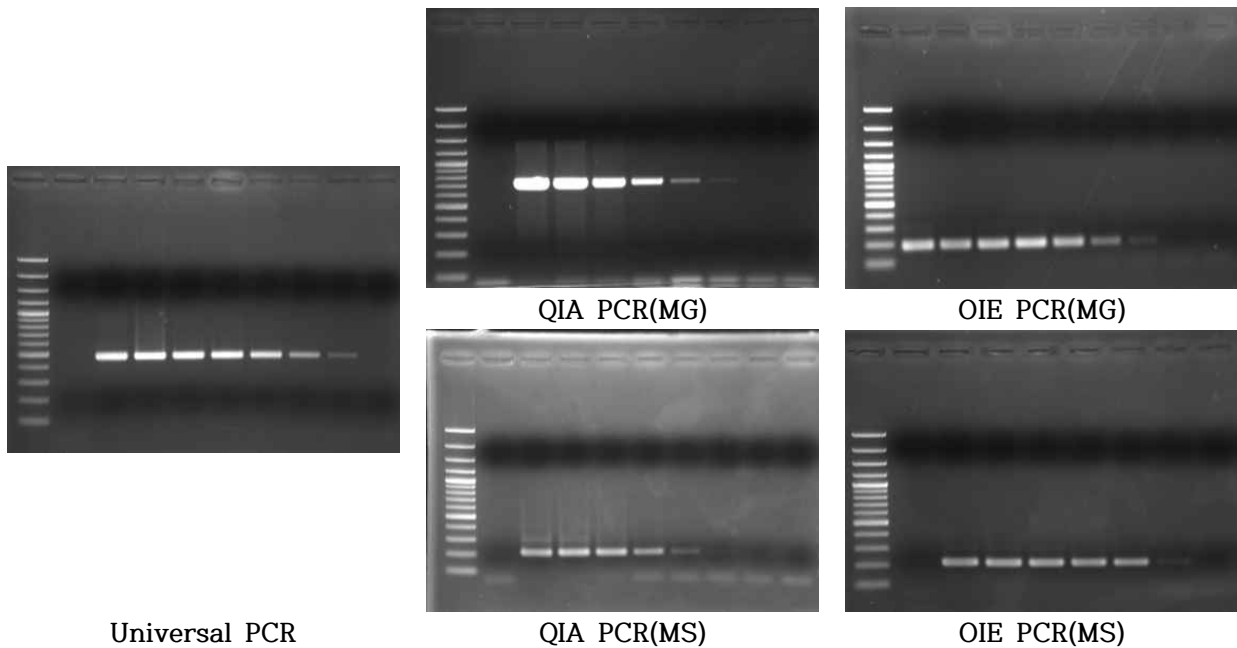
○ 기존의 진단법과 신규진단법의 민감도 및 특이도 분석

① 기존진단법

- Universal PCR법, QIA MG/MS PCR법(농림축산검역본부; 동물질병표준진단요령), OIE 마이코플라스마 PCR(세계동물보건기구; 마이코플라스마 매뉴얼)방법 <표 19> <그림 36>

Name	PCR	Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Target	Size (bp/Fluorophore)	Reference
Common	Universal	16S rRNA	MYCOA	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	Wild and Vaccine	464 bp	Rapid and sensitive PCR method for identification of mycoplasma species in tissue culture, 1993, 257-260.
			MYCOB	CGGATAACGCTTGCGACCTATG			
QIA	MG	lipoprotein	MG1	GGATCCCATCTCGACCAGGAGAAAA	Wild and Vaccine	732 bp	Molecular and Cellular Probes, 1997, 11: 211-216.
			MG2	CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA			
	MS	16S rRNA	MS1	GAAGCAAATAGTGATATCA	Wild and Vaccine	207 bp	
			MS2	GTCGTCTCGAAGTTAACAA			
OIE	MG	16S rRNA	MG-14F	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	Wild and Vaccine	185 bp	Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasma, 1997, 11, 211-216
			MG-13R	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC			
	MS	16S rRNA	MS-F	GAGAAGCAAAATAGTGATATCA	Wild and Vaccine	211 bp	
			MS-R	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA			

<표 19> 기존 닭 마이코플라즈마병 진단 PCR

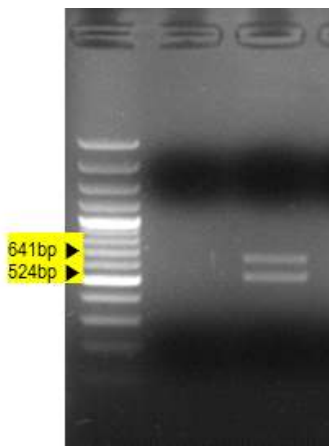


<그림 36> 기존 닭 마이코플라즈마병 진단 PCR

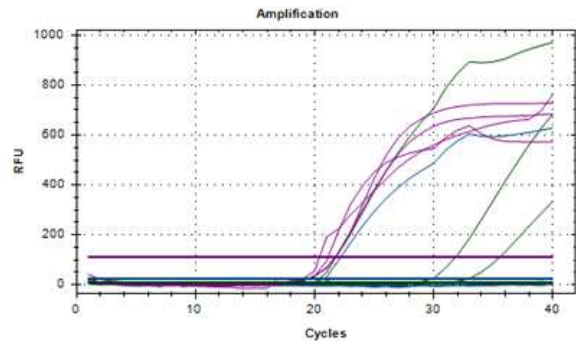
② 신규진단법 <표 20> <그림 37>

No.	PCR	Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Target	Size (bp/Fluorophore)	Reference
코젠	Conventional	NA	MG	unknown	Wild	409 bp	신규개발
					Vaccine	214 bp	
		MS	unknown	Wild	524 bp		
				Vaccine	614 bp		
	qPCR	NA	MG	unknown	Wild	NA /FAM	
					Vaccine	NA /HEX	
		MS	unknown	Wild	NA /FAM		
				Vaccine	NA /HEX		

<표 20> 신규 닭 마이코플라스마병 진단 PCR



코젠 Conventional PCR



코젠 qPCR

<그림 37> 신규 닭 마이코플라스마병 진단 PCR

③ 항원 검출방법 비교 결과 <표 21>

Mycoplasma (strain)		PCR sensitivity				
		Universal	QIA	OIE	Kogene	
					Conventional	qPCR
<i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG)	야외주 (5)	1 pg/μL	10 pg/μL	10 pg/μL	10 pg/μL	1 pg/μL
	백신주 (TS-11)	0.1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	0.1 pg/μL
<i>Mycoplasma synoviae</i> (MS)	야외주 (A4)	1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	0.1 pg/μL
	백신주 (vaxsafe)	1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	1 pg/μL	0.1 pg/μL

<표 21> 항원 검출방법 비교 결과

- 마이코플라스마 PCR 검출방법에 따른 민감도 비교 진행함
- MG 항원진단 방법은 백신주에 대해서는 universal PCR, 코젠 qPCR의 민감도가 0.1 pg/μL으로 가장 높은 것으로 확인되었고, 야외주에 대해서는 universal PCR, 코젠 qPCR가 1 pg/μL으로 민감도가 가

장 높은 것으로 확인됨

- MS 항원진단 방법은 백신주와 야외주에 대해서 코젠 qPCR의 민감도가 0.1 pg/ μ L으로 가장 높은 것으로 확인됨
- Universal PCR 방법은 MG와 MS에 specific한 PCR 방법이 아니기에 한계성이 분명함

○ 양계농가 시료에서 닭 마이코플라스마병(MG/MS) test-bed 검사 결과 <표 22> <표 23>

- 기존의 실험실의 분리동정된 MG/MS을 양성 대조군으로 이용하고, MG/MS 발생이력, 백신이력 등을 고려하여 시험농가 선정한 후 검사를 실시함 (5개소 농장). 항원 검출방법 중에서 기존의 universal PCR법, QIA MG/MS PCR법(농림축산검역본부; 동물질병표준진단요령), OIE 마이코플라스마 PCR(세계동물보건기구; 마이코플라스마 매뉴얼) 방법과 코젠 신규 conventional PCR, qPCR 방법을 비교한 결과, 상관성이 높게 나왔음

<i>M. gallisepticum</i>		PCR detection									
		Universal		QIA		OIE		Kogene conventional		Kogene qPCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
균 배양	Positive (n: 1)	1	0	1	0	1	0	1 ^a	0	1 ^a	0
	Negative (n: 4)	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4

^aField strain

<표 22>

- 5개의 농장을 test-bed로 *M. gallisepticum*에 대한 검사를 수행한 결과, 4개의 농장은 음성이었으며, 한 개의 농장은 양성으로 확인되었음. 1개의 양성농장의 MG는 야외주로 시퀀스 분석으로 확인되었으며, 시제품 코젠 conventional PCR와 qPCR에서도 야외주로 확인되었음
- 시제품 코젠 conventional PCR와 qPCR을 기존의 universal PCR법, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라스마 PCR방법과 비교한 결과, 동일한 진단결과를 보였음

<i>M. synoviae</i>		PCR detection									
		Universal		QIA		OIE		Kogene conventional		Kogene qPCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
균 배양	Positive (n: 3)	3	0	3	0	3	0	3 ^a	0	3 ^a	0
	Negative (n: 2)	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2

^aField strain

<표 23>

- 5개의 농장을 test-bed로 *M. synoviae*에 대한 검사를 수행한 결과, 2개의 농장은 음성이었으며, 3개의 농장은 양성으로 확인되었음. 3개의 양성농장의 MS는 시퀀스 분석하여 야외주로 확인되었으며, 시제품 코젠 conventional PCR와 qPCR에서도 야외주로 동정되었음
- Universal PCR법, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라스마 PCR방법과 코젠 시제품 conventional PCR, qPCR 방법을 비교한 결과, 동일한 진단결과를 보였음

- 각 항원진단법간의 민감도의 차이는 있었지만, 유사한 실험결과를 보였기에 대단위의 야외시료를 대상으로 한 효능평가를 진행함

○ **감별 진단법 야외시료 대상 효능평가**

- 전국적으로 MG/MS 의심축 또는 백신접종 개체로부터 샘플(trachea 및 cleft swab, air sac swab)을 취하여 기존의 진단법과 신규 진단법을 비교 평가함

① **샘플 수집 및 진단**

- ㉠ 샘플 수집기간 : 2021년 1월 ~2022년 1월
- ㉡ 수집대상 : 전국 마이코플라스마 감염 예상 농가
종계, 육계, 산란계 등

㉢ **진단법**

- Universal PCR법(참고문헌 참조)
- QIA MM/MS PCR법
(농림축산검역본부; 동물질병표준진단요령),
- OIE 마이코플라스마 진단 PCR법
(세계동물보건기구; 마이코플라스마 매뉴얼) 방법
- 코젠 신규 conventional PCR kit
- 코젠 신규 qPCR kit
- 배양법



② **닭의 마이코플라스마병(MG/MS)의 진단법 비교**

- ㉠ 닭마이코플라스마병(MG)의 항원 검출방법 비교 실험

No.	Farm	Source	Positive rate (%)						Sequence confirmation (Positive/Total No.)
			Direct PCR (pooled tracheal swab) ^a					Culture	
			Universal	QIA	OIE	Kogene conventional	Kogene qPCR		
1	C1	Broiler	1/1	1/1	1/1	1/1 ^g	1/1 ^g	1/1 ^c (1/5) ^d	1/1 ^g
2	C2	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1 ^e
3	C3	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
4	C4	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
5	C5	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
6	C6	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
7	C7	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
8	C8	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
9	C9	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
10	C10	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
11	C11	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
12	C12	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
13	C13	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
14	C14	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
15	C15	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
16	C16	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
17	C17	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
18	C18	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
19	C19	Broiler	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1 ^g	1/1 (1/5) ^f	1/1 ^g
20	C20	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
21	C21	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
22	C22	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
23	C23	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
24	C24	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
25	C25	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
26	C26	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
27	C27	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
28	C28	Others	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2 (0/10)	Not done
29	C29	Others	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
30	C30	Breeder	2/4	1/4	1/4	1/4 ^g	1/4 ^g	1/4 (1/20) ^f	1/4 ^g
31	C31	Breeder	2/4	1/4	1/4	1/4 ^g	1/4 ^g	1/4 (1/20) ^f	1/4 ^g
32	C32	Breeder	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4 (0/20)	0/4
33	C33	Breeder	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
34	C34	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
35	C35	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^b	1/1 ^b	1/1 (1/5) ^f	1/1 ^b
36	C36	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
37	C37	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	-h	-
38	C38	Breeder	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-
39	C39	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-
40	C40	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^b	1/1 ^b	-	-
41	C41	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^b	1/1 ^b	-	-
42	C42	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-

a: Pooled sample의 경우 5개의 기관스왑 시료를 1개 시료로 혼합하여 일반 PCR을 실시함

b: vaccine주

c: PCR 검사용 혼합(pooled) 시료에 상응하는 5개 조합의 시료군의 균배양 검사 결과

: [양성군 수]/[총검사군 수]

d: 개별 스왑시료(농장당 최소 5점 이상)에 대한 균배양 검사 결과: [양성시료 수]/[검사시료 수]

e: not MG

f: 분리중

g: 야외주

h: 진행중

<표 24> 마이코플라스마병(MG)의 항원 검출방법 비교 실험

㉠ 양계농가 시료에서 마이코플라즈마(MG) 항원 양성을 종합표 <표 25>

Source	농가수	PCR positive/tested samples (%)				
		Universal	QIA	OIE	Kogene conventional	Kogene qPCR
Broiler	27	19/27 (70.4)	2/27 (7.4)	2/27 (7.4)	1/27 (3.7)	2/27 (7.4)
Breeder	5	5/5 (100.0)	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)
Layer	8	8/8 (100.0)	3/8 (37.5)	3/8 (37.5)	3/8 (37.5)	3/8 (37.5)
Others	2	1/2 (50.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
Total	42	33/42 ^a (78.6)	7/42 (16.7)	7/42 (16.7)	6/42 ^b (14.3)	7/42 ^c (16.7)

a: Seven samples were identified as MG by sequencing; Other samples were identified as non-MG/MS.

b: Three vaccine strains and three wild type strains

c: Three vaccine strains and four wild type strains

<표 25> 양계농가 시료에서 마이코플라즈마(MG) 항원 양성을 종합표

- 42개의 농장을 대상으로 확보된 시료를 이용한 *M. gallisepticum* 항원 검출방법 중 universal PCR법, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라즈마 PCR방법과 코젠 신규 conventional PCR, qPCR 방법을 비교한 결과, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라즈마 PCR방법과 시제품 코젠 conventional PCR, qPCR 결과의 상관성이 높게 나타났음.
그러나, universal PCR법은 위양성율이 61.9%으로 상당히 높았음. Universal PCR 방법은 mycoplasma spp.를 동정할 수 있는 방법으로 위의 시료에서는 *Mycoplasma gallinaceum*, *Mycoplasma iners*, *M. gallinacean* 등이 확인되었으며, 이외에도 *Actinobacterium* 등 세균도 확인되어 특이도가 다른 방법들에 비해 현저히 낮음이 확인되었음.
- QIA MG/MS PCR: 7/42(16.7%), OIE 마이코플라즈마 PCR: 7/42(16.7%), 코젠 시제품 conventional PCR: 6/42(14.3%), 코젠 시제품 qPCR 7/42(16.7%)를 보였는데 C19번 시료에서 코젠 신규 conventional PCR에서만 음성으로 확인됨. 이는 각 실험법의 민감도는 유사하지만, 시료가 낮은 ct 값(ct=34)을 보였기에 오차범위로 사료됨.
- MG에 대한 야외시료 효능평가에서 42개 시료를 확보하여 총 7개의 MG를 진단하였고, 이중에서 3개의 백신주와 4개의 야외주를 감별하였음.
- 기존의 PCR후 시퀀싱을 통한 백신주와 야외주 감별 방법에 비하여 코젠 시제품 conventional PCR, qPCR 방법은 정확도뿐만 아니라 결과 판정까지의 소요시간, 시험자의 편의성을 크게 증대시키는 것으로 판단됨. 현재 추가적인 농장적용이 진행 중에 있음

㉔ 닭 마이코플라스마 병(MS)의 항원 검출방법 비교 실험 결과 <표 26>

No.	Farm	Source	Positive rate (%)					Culture	Sequence confirmation (Positive/ Total No.)
			Direct PCR (pooled tracheal swab)a						
			Universal	QIA	OIE	Kogene conventional	Kogene qPCR		
1	C1	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 ^b (0/5) ^c	0/1 ^d
2	C2	Broiler	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	1/1 (1/5)	1/1 ^e
3	C3	Broiler	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	1/1 (1/5)	1/1 ^e
4	C4	Broiler	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	1/1 (1/5)	1/1 ^e
5	C5	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
6	C6	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
7	C7	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
8	C8	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
9	C9	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
10	C10	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
11	C11	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
12	C12	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
13	C13	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
14	C14	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
15	C15	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
16	C16	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
17	C17	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
18	C18	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
19	C19	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
20	C20	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
21	C21	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
22	C22	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
23	C23	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
24	C24	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
25	C25	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
26	C26	Broiler	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	Not done
27	C27	Broiler	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
28	C28	Others	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2 (0/10)	Not done
29	C29	Others	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
30	C30	Breeder	2/4	1/4	1/4	1/4 ^e	1/4 ^e	1/4 (1/20) ^f	1/4 ^e
31	C31	Breeder	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4 (0/20)	0/4
32	C32	Breeder	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4 (0/20)	0/4
33	C33	Breeder	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
34	C34	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
35	C35	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
36	C36	Layer	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1 (0/5)	0/1
37	C37	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	- ^g	-
38	C38	Breeder	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-
39	C39	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	-	-
40	C40	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	-	-
41	C41	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	-	-
42	C42	Layer	1/1	1/1	1/1	1/1 ^e	1/1 ^e	-	-

a: Pooled sample의 경우 5개의 기관스왑 시료를 1개 시료로 혼합하여 일반 PCR을 실시함

b: PCR 검사용 혼합(pooled) 시료에 상응하는 5개 조합의 시료군의 균배양 검사 결과

: [양성균 수]/[총검사균 수]

c: 개별 스왑시료(농장당 최소 5점 이상)에 대한 균배양 검사 결과 : [양성시료 수]/[검사시료 수]

d: not MS

e: 야외주

f: 분리중

g: 진행중

<표 26> 닭 마이코플라스마 병(MS)의 항원 검출방법 비교 실험 결과

㉔ 양계농가 시료에서 마이코플라즈마(MS) 항원 양성을 종합표 <표 27>

Source	농가수	PCR positive/tested samples (%)				
		Universal	QIA	OIE	Kogene conventional	Kogene qPCR
Broiler	27	19/27 (70.4)	3/27 (11.1)	3/27 (11.1)	3/27 (11.1)	3/27 (11.1)
Breeder	5	5/5 (100.0)	1/5 (20.0)	1/5 (20.0)	1/5 (20.0)	1/5 (20.0)
Layer	8	8/8 (100.0)	5/8 (62.5)	5/8 (62.5)	5/8 (62.5)	5/8 (62.5)
Others	2	1/2 (50.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)	0/2 (0.0)
Total	42	33/42 ^a (78.6)	9/42 (21.4)	9/42 (21.4)	9/42 ^b (21.4)	9/42 ^b (21.4)

a: Nine samples were identified as MS by sequencing; Other samples were identified as non-MG/MS.

b: Nine wild type strains

<표 27> 양계농가 시료에서 마이코플라즈마(MS) 항원 양성을 종합표

- 42개의 농장을 대상으로 확보된 시료를 이용한 *M. synoviae* 항원 검출방법 중 universal PCR법, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라즈마 PCR방법과 코젠 시제품 conventional PCR, qPCR 방법을 비교한 결과, QIA MG/MS PCR법, OIE 마이코플라즈마 PCR방법과 코젠 시제품 conventional PCR, qPCR 결과의 상관성이 높게 나타났음.
- 그러나, universal PCR법은 위양성율이 57.2%으로 상당히 높았음. Universal PCR 방법은 *M. synoviae*와 *M. gallisepticum* 외의 mycoplasma spp.를 동정할 수 있는 방법이지만, 다른 세균들도 확인되었음
- QIA MG/MS PCR: 9/42(21.4%), OIE 마이코플라즈마 PCR: 9/42(21.4%), 코젠 시제품 conventional PCR: 9/42(21.4%), 코젠 시제품 qPCR 9/42(21.4%)를 보였음.
- MS에 대한 야외시료 효능평가에서 42개 시료를 확보하여 총 9개의 MS를 진단하였고, 모두 야외주로 확인되었음.
- MG의 실험결과와 유사하게 기존의 PCR 후 시퀀싱을 통한 백신주와 야외주 감별 방법에 비하여 코젠 시제품 conventional PCR, qPCR 방법은 정확도 뿐만 아니라 결과 판정까지의 소요시간, 시험자의 편의성을 크게 증대시키는 것으로 판단됨. 현재 추가적인 농장적용이 진행 중에 있음
- 현재 국내에 MG, MS 모두 생균백신이 적용되고 있어 야외에서 분리되는 균주에 대한 병원성 균주 또는 백신주 여부에 대한 감별동정이 정확한 진단을 위해 필수적임. 현재까지 알려진 유전자 시퀀싱 방법과 비교하였을 때, 신규 코젠 키트는 시간의 단축뿐 아니라 효율성도 기여한다고 판단됨

[1차년도, 위탁연구기관 ((주)체리부로) : MS, MG 감염의심축 샘플 제공]

-감염이 의심되는 농장으로부터 닭 마이코플라즈마(MS, MG) 시료를 획득, MS, MG의 항원 존재 확인 후 주관연구기관으로 발송

- MS 감염이 의심되는 농장으로부터 trachea 및 cleft swab을 실시하여, 15개 1회, 20개 2회, 10개 1회

총 65개 건국대에 전달함

- MG 감염이 의심되는 농장으로부터 trachea 및 cleft swab을 실시하여, 10개씩 1회, 20개씩 3회 총 70개 건국대에 전달함

- 총 135개의 샘플 중 31개의 MS야외주와 2개의 MG야외주가 확인됨

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

1. 정성적 연구개발 성과

1-1. 국내 닭 마이코플라스마 병(MG, MS) 야외주 분리주 확보

- 총 17주의 MS 야외주를 획득하였으며, 그 중 8주를 순수분리하여 확보함.
- 총 2주의 MG 야외주를 획득하였으며, 그 중 2주를 순수분리하여 확보함.

1-2. 국내 닭 마이코플라스마 병(MG, MS)의 야외 분리주의 전장유전체 확보

- 총 5주의 마이코플라스마 시노비에(MS) 야외분리주의 전장유전체를 확보함.
- 모두 circular 형태, error correction이 완료된 genome으로, 획득한 전장유전체는 GenBank에 업로드함.
- Accession number: CP082192 - CP082196.

- 총 2주의 마이코플라스마 갈리셉티쿰(MG) 야외분리주의 전장유전체를 확보함.

- 모두 circular 형태, error correction이 완료된 genome으로, 획득한 전장유전체는 GenBank에 업로드함.

- Accession number: CP070622

1-3. 전장유전체 비교 분석을 통한 닭 마이코플라스마 병(MG, MS) 야외 분리주와 국내 시판중인 백신주 간 감별 진단법 개발

- 마이코플라스마 시노비에(MS)의 경우, GenBank로부터 획득한 백신 관련 strain MS-H, 86079-NS의 전장유전체를 각각 중국, 미국, 브라질에서 분리된 HN01, ATCC25204(type strain), MS53의 야외주 및 5개의 한국 야외주와 비교분석. 감별용 SNP를 특정함.
- 비교분석 결과를 기반으로 야외주는 409bp, 백신주는 214bp의 PCR 결과물을 갖는 Conventional PCR 및 시스템을 설계함.
- 비교분석 결과를 기반으로 야외주, 백신주를 타겟하는 quantitative PCR 프라이머, 프로브 및 시스템을 설계함.
- 두 PCR 검출 시스템 모두 설정한 특이도, 민감도 및 정밀도 테스트를 통과함.

(1) 정성적 연구개발성과

(2) 정량적 연구개발성과

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2020-2021)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	학술발표	목표(단계별)	1	50%
		실적(누적)	1	50%
	교육지도	목표(단계별)	1	50%
		실적(누적)	1	50%
	계	목표(단계별)	2	100%
		실적(누적)	2	100%

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Genome Analysis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Mycoplasma synoviae Isolates from Korea	Pathogens	송용준, 라태민	10	스위스	MDPI	SCIE	OCT, 2021	2076-0817	100
2	Complete Genome Sequence of Mycoplasma gallisepticum Strain KUVMG001, an Isolate from South Korea	Microbiology Resource Announcement	송용준	19	미국	ASM	비SCIE	MAY, 2021	2576-098X	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국가금학회 제38차 정기총회 및 학술발표회	Ke Shang	2021년 11월 18일	대전컨벤션센터	대한민국

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	마이크로플라스마 갈리셉티쿰의 야외주와 백신주를 동시에 구별하여 검출하기 위한 조성물 및 이를 이용한 검출방법	주식회사 코젠 바이오텍	2022.01.04	10-2022-0000654	-	-	-	100		

○ 지식재산권 활용 유형

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

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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²) (22쪽 중 8쪽)]

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증어부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

- * 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

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

- * 1」 국제 표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹	사업화 형태 ²	지역 ³	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

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

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)
(22쪽 중 9쪽)]

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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

□ 고용 창출

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

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)]

(22쪽 중 10쪽)

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황														
			학위별				성별		지역별								
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타				

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 11쪽)

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

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

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과]

- 수의학 및 농생명 관련학과 학부 재학생 대상 수행과제 연계 마이코플라즈마병(MG/MS) 감별진단법 현장실습 교육실시
- 교육일시 : 2021.01.04.~02.26.
 - 교육장소 : 전북대학교 특성화캠퍼스
 - 교육인원 : 17명

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

2) 목표 달성 수준

최종목표

추진목표	달성내용	달성도(%)
○ 닭 마이코플라즈마병 자연감염축과 예방접종축 감별 진단법 개발	<ul style="list-style-type: none"> • MS 감별 진단법 개발 • MG 감별 진단법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100% ○ 100%

세부목표

추진목표	달성내용	달성도(%)
○ MS, MG 야외분리주 순수분리 및 야외 분리주 전장유전체 확보	○ MS 야외주 8주 순수분리 완료 ○ MG 야외주 2주 순수분리 완료 ○ MS 야외주 5주의 전장유전체 확보 ○ MG 야외주 2주 전장유전체 확보	○ 66.25
○ MG, MS 야외분리주와 국내 시판중인 백신주 간 감별 진단 마커 개발	○ MS 감별진단 마커 발굴 ○ MS 감별진단 Conventional 및 Real-time PCR 개발 ○ MG 감별진단 마커 발굴 ○ MG 감별진단 Conventional 및 Real-time PCR 개발	○ 100% ○ 100% ○ 100% ○ 100%
○ 감별 진단법의 민감도 및 효능평가	○ 감별 진단법의 효능평가 완료 ○ 감별 진단법의 민감도 평가 완료	○ 100% ○ 100%
○ 야외 효능평가를 위한 Test-bed 선정	○ 위탁 연구기관 회위농가 중 MG/MS 발생이력, 백신이력 등을 고려하여 시험농가 5개소 이상 선정 ○ 육계, 산란계, 종계, 토종닭 등 총 5곳의 기관스왑 시료 확보 및 항원검사 수행	○ 100% ○ 100%
○ 감별 진단법 야외시료 대상 효능평가	○ 기존 진단법 및 신규진단법의 민감도와 특이도 분석 ○ 양계농가 시료에서 MG/MS test-bed 검사결과, 항원 검출방법중에서 기존 진단법과 신규진단법 비교결과, 상관성이 높게 나옴 ○ 감별 진단법 야외시료 대상 효능평가 결과, 현재까지 알려진 유전자 시퀀싱 방법과 비교하였을 때, 신규 진단키트는 시간 단축 및 효율성 기여하는 것으로 확인됨	○ 100% ○ 100% ○ 100%

4. 목표 미달 시 원인분석

목표 미달 원인 자체분석 내용

마이코플라즈마 갈리셉티쿰 (MG) 의 야외주 분리 미달 원인

1. 현재 한국의 농장의 MG 야외주 감염율이 높지 않음
 - 과제 진행 중 분리한 샘플들의 MG target PCR 결과, 양성률이 2%에 불과함.
 - 과거 타 기관에서 진행한 연구 결과에서 MG PCR 양성률은 0%로 나타났음. (Seroprevalence and molecular detection of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae infection in broiler breeder in Jeonbuk providence, Korea 광길한, 2016)
 - MG 백신의 보급 및 사용율이 높아지고, 그 효과를 보임에 따라 MG 야외주에 감염된 농장 및 개체의 수가 감소한 것으로 추정됨.
2. 고병원성 AI와 COVID-19 유행으로 인한 샘플링 양 부족
 - 2020년 10월부터 2021년 초까지 고병원성 조류인플루엔자가 유행함.
 - COVID-19 감염증의 발생과 그로 인한 방역, 거리두기 단계가 격상됨에 따라 샘플링을 위한 출장 등이 난항을 겪음.

자체 보완활동

①MG 야외주 양성률이 낮고, ②샘플링 수가 부족하여 MG 야외주 분리에 난항을 겪을 것으로 예상되어 다음과 같은 보완활동을 시행함.

1. 연구계획의 수정

- MG의 샘플링 및 분리에 난항을 겪을 것을 예상하고, 연구계획의 차질을 막기위해 과제 2년차의 연구 진행 방식을 기존 방식에서 수정함.
- MG의 경우, MS와 달리 GenBank database에 다수의 전장유전체가 존재함. 이들 전장유전체와 획득한 MG 야외주 유전체 1개를 사용하여 진단 마커 개발을 선제적으로 시행한 뒤, 2년차에 분리한 야외주 샘플들을 이용하여 차후 검증을 시행함.

2. 샘플링 수의 증대

- 기존의 방식과 경로를 유지 시, 샘플링 수가 감소할 것으로 예상하였음.
- 체리부로를 통해 들어오는 샘플링 빈도를 1년차와 같이 유지해줄 것을 요구함.
- 병성감정 의뢰 유래 닭의 샘플링을 증대함.
- LBM 유래 닭 등 추가적인 닭 샘플링 경로를 만들.

연구 개발 과제의 성실성

과제를 진행함에 있어 목표 미달이 발생하였음. 하지만 연구과정에 있어 결함이 발생할 것을 미리 파악하고 해당 사안을 보완하기 위해 다양한 보완활동 및 연구계획을 수정한 점 등에서 연구 개발 과제에 성실하게 임하였음.

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

건국대

- 과제 수행 전반의 관리 및 운영, 시행을 담당
- 과제 수행으로 인한 연구팀의 기술 고도화 및 이를 통한 경쟁력 향상
- 과제 수행을 통해 작성, 발표한 논문 2편 확보

코젠바이오텍

- 과제 수행의 주요 기술, 개발인 감별진단법의 개발
- 과제 수행의 주요 기술, 개발인 감별진단법의 민감도, 특이도 및 정밀도 확인

전북대

- 과제 수행으로 인한 연구팀의 기술 고도화 및 이를 통한 경쟁력 향상
 - 과제 수행을 통하여 발생한 결과의 학술발표를 통한 학술자료 확보
 - 닭 마이코플라스마 질병의 효과적인 예방-제어를 통한 양계 산업의 안정성 강화
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

건국대

- 획득한 MG, MS 야외분리주를 차후 연구에 활용
- 획득한 MG, MS 전장유전체를 차후 연구에 활용

코젠바이오텍

- 개발한 닭 마이코플라스마병 감별진단법의 특허등록 과정 중이며, 종료 1년차와 2년차에 특허 등록 및 제품화를 실시하여 국내 닭 마이코플라스마병 예방 및 방역에 주요 역할을 할 것으로 기대

전북대

- MG, MS 스크리닝 매뉴얼 확립을 통한 진단 신속화/효율화
-

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	320061-2		
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	닭 마이코플라즈마병(MG, MS) 예방접종축과 자연감염축 감별 프로토콜 개발			과제유형	(개발)
연구개발기관	건국대학교 산학협력단			연구책임자	이상원
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.04.29. - 2020.12.31	230,000	76,700	306,700
	2차년도	2021.01.1. - 2021.12.31	300,000	100,000	400,000
	계		530,000	176,700	706,700
참여기업	(주)코젠바이오텍, (주)체리부로, 참여기관: 전북대학교				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2022년 2월 10일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 산학협력단	교수	이 상 원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	이 상 원	
----	-------	---

1. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (√우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구를 통해 국내에서 처음으로 닭 마이코플라스마 병원체(MG, MS) 들의 전장유전체를 획득하고, 분석하였음. 또한 그 결과를 이용하여 MG, MS 백신주와 야외주를 감별진단할 수 있는 PCR 방법 (conventional 및 real-time)을 개발하고 그에 대한 평가를 마쳤음.

국내 양계농장에 감염율이 높음에도 기존에 국내에서 연구되지 않은 병원체에 대해서 시도한 적이 없는 방식으로 접근한 점에서 창의적이며, 병원체의 분리에서부터 감별진단법의 개발, 그 평가에까지 이르는 일련의 연구방식이 단계적이고 통일성 있게 진행되었으므로 우수함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (√우수, 보통, 미흡, 극히불량)

닭 마이코플라스마병의 감별진단법은 현재 개발이 완료된 상황으로 상용화 단계의 사전준비는 마친 상태임. 현 상황에서 닭 마이코플라스마병 방역 정책을 기준으로 짐작해볼 때, 감별진단법의 상용화가 완료된 이후 파급효과는 우수할 것으로 생각됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : √우수, 보통, 미흡, 극히불량)

닭 마이코플라스마병(MG)은 종계장·부화장 방역관리요령에 등재된 검사대상 가축전염병의 하나로 등재되어있음. 이 경우 주기적인 모니터링을 해야하며, 현재 상황에서는 닭의 마이코플라스마 청정계군을 유지하기 위해 시험소, 기업 등에서 백신을 공급, 판매하고 있는 상황임. 이 경우, 필수적인 것이 닭 마이코플라스마병의 자연감염과 백신접종축의 구분이며, 따라서 이번 연구개발결과의 활용가능성은 우수할 것으로 판단됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : √우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구개발과제는 COVID-19 및 AI 유행상황에서도 해당 목표를 달성하기 위해 성실히 수행되었음. 기존 설정한 목표 달성을 위해 과제 연구과정의 추가적인 실행 및 수정보완이 이루어졌으며, 따라서 연구개발 수행노력의 성실도는 우수했다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : √우수, 보통, 미흡, 극히불량)

공개발표된 연구개발성과는 모두 기존의 계획에 맞추어 성실하게 수행되었음. 두 건의 논문발표 (SCI:1건, 비SCI: 1건)와 학술발표와 홍보전시 모두 기존 계획 및 목표를 달성하였음. 향후 종료 1차년도에 성과 또한 달성 가능성이 높음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
MG, MS 야외분리주 순수분리 및 전장유전체 확보	20	66.25	전반적인 수행은 우수했으나, 검출된 대부분의 MG가 백신유래주임이 판별되어 야외분리주 분리 목표수에 도달하지 못함
MG, MS 야외분리주와 국내시판 백신주 간 감별진단 마커 개발 및 감별진단법 개발	50	100	주요 목표중 하나이며 문제없이 진행됨
감별 진단법의 민감도 및 효능평가	30	100	감별진단법의 민감도, 특이도, 정밀도 및 야외시료를 이용한 효능평가를 완수함
합계	100점	93.25점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발과정은 전반적으로 우수하게 진행되었으며, 과정 중에 차질이 있었으나 개발결과 및 목적달성은 기존 계획대로 완수하였음.

연구 과제는 기존에 수행되지 않은 방식의 접근으로 감별진단법을 개발하였으며, 그 결과로 목표한 기준들에 부합하는 결과물을 생산함.

일련의 연구과제들은 통일성 있게 단계적으로 진행되었음. 또한, 각 단계별 다양한 연구주체들 간의 의사소통이 원활히 이루어지고 단계별 목적달성을 위한 서로 간의 협력이 우수하게 진행되었다는 점이 우수한 연구개발결과를 달성할 수 있었던 원인 중 하나라고 평가함.

연구 과제는 현재 전 세계적인 전염병 유행이라는 악조건 하에서도 성실하고 계획적으로 이행되었음.

본 연구개발결과 중 2건의 논문과 1건의 학술발표, 1건의 홍보전시가 이루어졌으며 이는 학술적 측면에서의 과제결과가 우수하다고 볼 수 있음. 또한 종료 후 목표되어있는 논문 및 발표에도 무리가 없을 것으로 생각됨.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

목표했던 마이코플라즈마 갈리셉티쿰 (MG) 야외주 분리주의 건수에는 도달하지 못했으나, 원인 분석을 통한 자체 보완활동으로 인해 국내 MG 야외분리주와 백신주를 감별 진단할 수 있는 키트를 개발 및 검증을 실시하였으므로 이를 평가시 고려해 줄 것을 요청드립니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

닭 마이코플라즈마병의 예방 및 방역에 대한 현재 정책 방향(종계장·부화장 방역관리 요령)으로 짐작할 때, 그 활용가치는 현 상황보다 더 높을 것으로 예상됨.

현재 특허출원은 완료한 상태로 특허등록이 완료되면 국내 닭 마이코플라즈마병 방역에 있어 중요 역할을 수행할 수 있는 상용화 제품을 생산할 것으로 예상됨.

연구개발 과정 중 하나인 감별진단법의 민감도, 특이도 및 효능평가를 통한 검증으로 시험소 및 양계질병 진단 업계에서 본 감별진단법이 사용 가능할 것으로 예측됨.

본 연구는 앞서 서술하였듯 가축질환의 예방 및 방역 측면에서 그 활용도가 높을 것으로 예상되며, 추가적인 연구나 조치가 진행된다면, 실제적 적용과 관련되어 진행해야 할 것임.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	닭 마이코플라즈마병 병원체의 전장유전체 획득
②	닭 마이코플라즈마병 병원체 야외주 및 백신주 감별진단방법

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	차후 연구 및 개발에 활용
②의 기술	현재 특허등록과정 중이며, 상용화 시 국내 닭 마이코플라즈마병 예방 및 방역에 주요 역할을 할 것으로 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책·홍보		기타 (타연구활용액)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책활용		홍보전시
													SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	건	건		
가중치	30	0				0								25	15	15		15		
최종목표	2	2				2						2	1	1	1	2		2		
연구기간내 달성실적	1	0				0						1	1	1	1	1		1		
연구종료후 성과창출 계획	1	2				2						1	0	0	0	1		1		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

주 의

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