

(옆면)

(앞면)

321016-1

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004151-01

송아지 설사병 유발 바이러스 및 Giardia 동시 진단을 위한 POC 검사 키트 개발

2022.09.13

주관연구기관 / (주)보레다바이오텍
협동연구기관 / 경북대학교
전북대학교

송아지 설사병 유발 바이러스 및 Giardia 동시
진단을 위한 POC 검사 키트 개발

2022

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “송아지 설사병 유발 바이러스 및 Giardia 동시 진단을 위한 POC
검사 키트 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01 ~ 2022. 03. 31)과제의 최종보고서로
제출합니다.

2022. 09. 13.

주관연구기관명 : (주)보레다바이오텍 (대표자) 최 동 욱 (인)

협동연구기관명 : 경북대학교산학협력단 (대표자) 김 지 현 (인)

전북대학교산학협력단 (대표자) 조 기 환 (인)

주관연구책임자 : 최 동 욱

협동연구책임자 : 최 경 성

협동연구책임자 : 박 진 호



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명		가축질병대응기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품개발				연구개발과제번호 321016-1		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	60%	2순위 LB0708	30%	3순위 LB0701	10%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB0201	60%	2순위 RB0299	30%	3순위 RB0203	10%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		송아지 설사병 유발 바이러스 및 <i>Giardia</i> 동시 진단을 위한 POC 검사 키트 개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 03. 31 (12개월)						
총 연구개발비		총 450,000천원 (정부지원연구개발비: 400,000 천원, 기관부담연구개발비 : 50,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		축산농가 현장 활용형의 바이러스 설사관련 후보물질 발굴을 통해 현장에서 적용 가능한 송아지 설사유발 바이러스(diarrhea-associated viruses) 신속 진단 제품 개발				
		전체 내용		1. 설사증 송아지의 역학 조사를 통한 소 코로나바이러스 (BCV), 소 로타바이러스(BRV), 소 바이러스 설사 바이러스 (BVDV)의 유행률 조사 및 유전적 특성 분석 2. 야외 바이러스(BCV, BRV, and BVDV) 분리 및 배양 3. BCV, BRV, and BVDV 항원 진단키트 시제품 개발 4. 현재 시판중인 <i>Giardia duodenalis</i> 의 기존 문제점을 보완한 시제품 제작 5. 진단 키트 시제품에 대한 야외 임상 및 실증 시험을 통한 유효성 평가 6. BCV, BRV, and <i>Giardia duodenalis</i> 와 BVDV-1b and BVDV-2a 항원 진단키트 신속진단키트 개발 및 최적화				
		1단계 (해당 시 작성)	목표					
			내용					
		n단계 (해당 시 작성)	목표					
	내용							

연구개발성과	1. 제품화 1종 : 송아지 설사 항원 동시 신속진단키트 <연구개발성과 유형>											
	구분	논문	특허	보고서 원문	정책 제안	기술 요약 정보	소프트웨어	고용 창출	생명자원		신품종	
	예상 성과 (N/Y)	1 (Y)	1 (Y)	1 (Y)	1 (Y)	1 (Y)		2 (Y)	생명 정보	생물 자원	정보	실물

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	1. 활용계획 1) 축산업에 치명적인 요인으로 작용하는 소 코로나바이러스는 국내 뿐만 아니라 해외에서도 꾸준히 발병하여 심각한 문제를 야기하고 있으므로 국가별 방역관리 체계 확립과 질병의 조기 진단을 위한 모니터링 도구로써 활용 가능. 2) 본 연구과제로 개발된 BCV 항원 신속진단키트를 활용하여 국내 BCV 박멸사업 및 진단 시스템의 구축에 기여 할 것으로 판단됨. 3) 국가 질병관리 및 데이터베이스 구축 등의 가축 질병 예찰 및 방역에 유용한 도구로 활용 가능함. 4) 보다 많은 질병에 적용 가능한 기술 기반으로 사용될 것이며, 이를 기반으로 더 많은 타겟을 분석할 수 있는 차세대 단백질 바이오칩 개발에 활용 가능함. 5) 수의학분야의 진단, 치료제 및 백신개발을 위한 중요한 도구로 활용가능										
	2. 기대효과 1) 기술적 측면 - 현장조기 진단 가능한 제품개발 기술력 확보 - 가축질병통제를 위한 데이터베이스 구축을 위한 기반 기술 확보 - 유효항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보 - 현장에서 신속정확하게 조기검진 및 제어시스템 확보 2) 경제·산업적 측면 - 조기진단/제어시스템을 통한 축우산업 활성화 및 고부가가치 창출 - 기존 진단법과 비교 시 시간, 비용 절감 효과 - 제품경쟁력 우위확보를 통한 시장우위 선점 - 신시장창출: 현장검사를 통한 조기진단										

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	2	1	1		1			생명 정보	생물 자원		정보	실물
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)	바이러스성 설사		지알디아		진단키트		예방		항원진단			
영문핵심어 (5개 이내)	Viral diarrhea		<i>Giardia duodenalis</i>		Diagnostic kit		Prevention		Antigen detection			

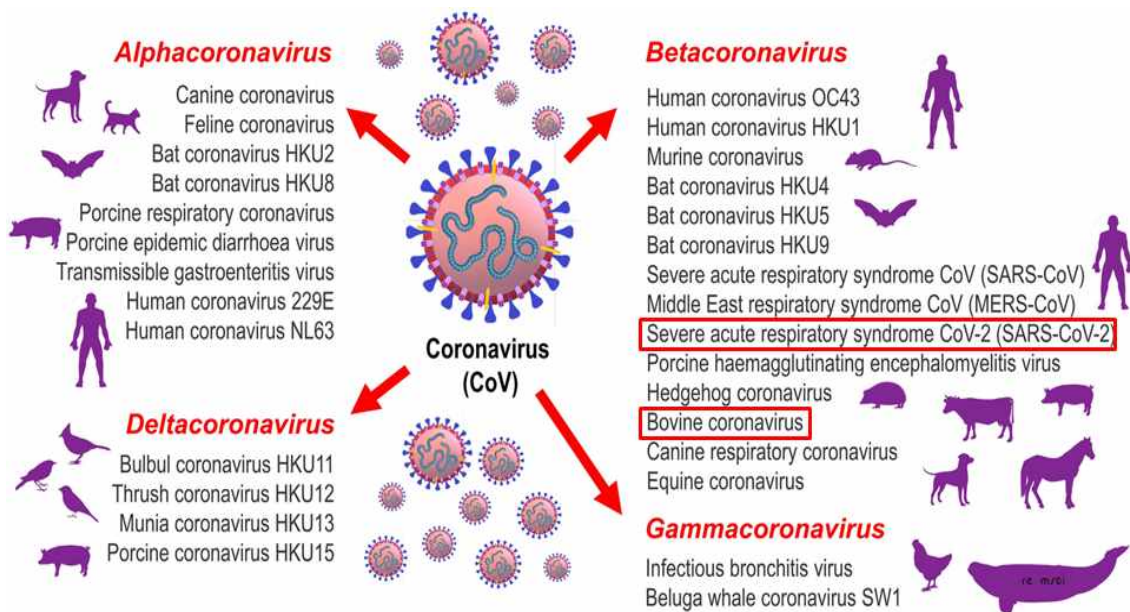
〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	4
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	21
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	47
4. 목표 미달 시 원인분석	58
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	59
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	60
별첨 자료	63

1. 연구개발과제의 개요

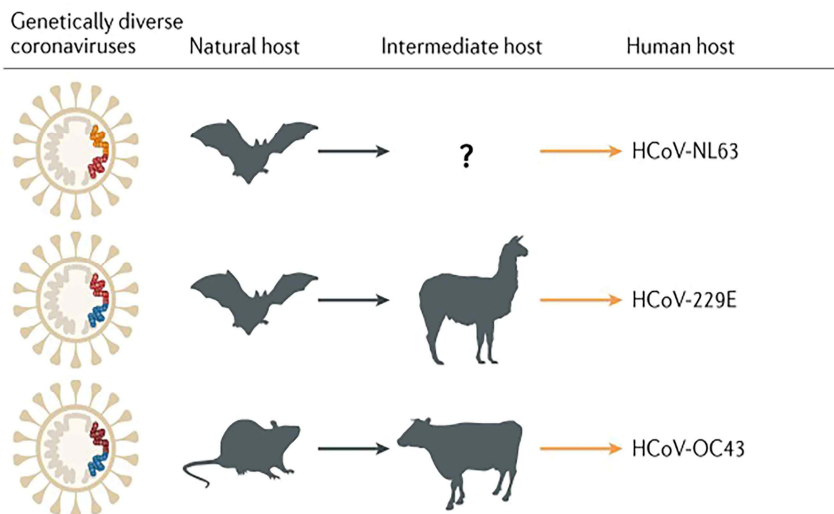
가. 연구개발의 개요

- 소 코로나바이러스(Bovine Coronavirus, BCoV, BCV)는 신생 송아지에서 설사(Neonatal calf diarrhea)를 유발하는 주된 원인체이며, 송아지 및 성우에서 겨울철 설사(winter dysentery), 모든 연령의 소에서 호흡기질환(bovine respiratory disease complex; BRDC)을 유발하는 것으로 알려져 있음
- BCV로 인한 설사증은 한국을 비롯하여 전 세계 축산업에 심각한 경제적 손실을 야기하고 있음
- BCV는 *Betacoronavirus* genus에 속하며, 현재 전 세계적으로 문제가 되고 있는 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)와 같은 group에 속해 있음

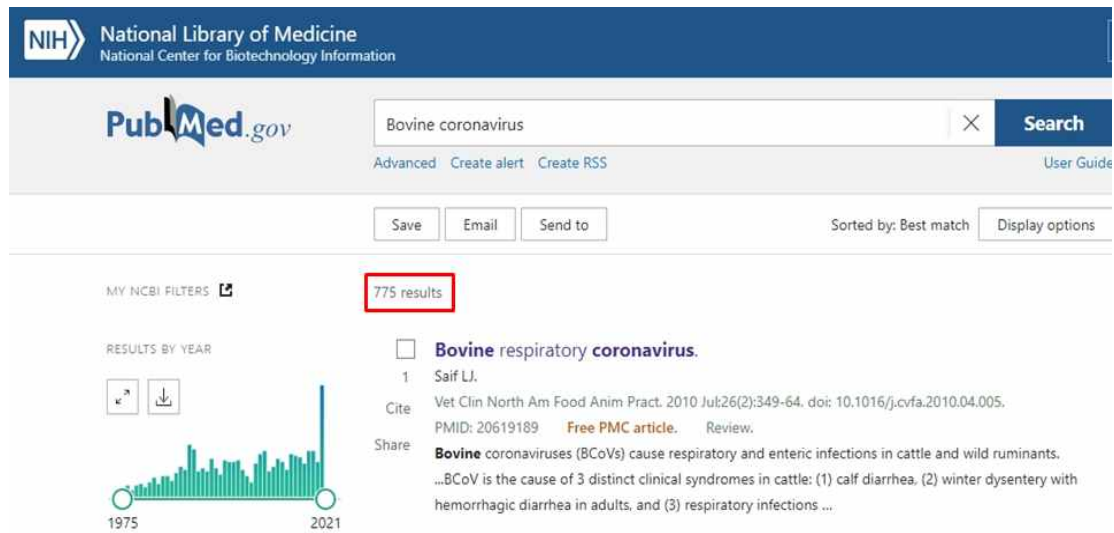


- 2008년 이후로, BCV는 중간전파와 유전적 재조합에 기인하여 사람, 돼지, 말 및 개와 함께 *Betacoronavirus* 1 species로 새롭게 분류되었으며, quasispecies (host-range variants)로 간주되고 있음

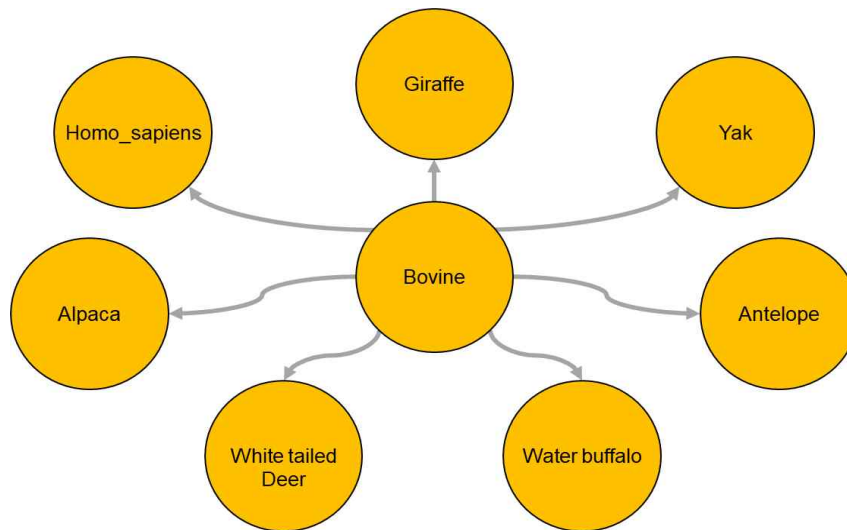
- 실제 사람에서 발생한 HCoV-OC43은 BCV가 그 조상으로 중간전파를 통해 진화되어왔고, 1890년대에 사람에서 감염을 유발하였으며, BCV 유사 바이러스의 인수공통 감염 사례가 상당수 보고 되고 있음.
- 국내의 경우 BCV에 대한 연구는 2010년 이전에 머물



러 있을 뿐만 아니라, 최근 연구결과는 거의 전무함

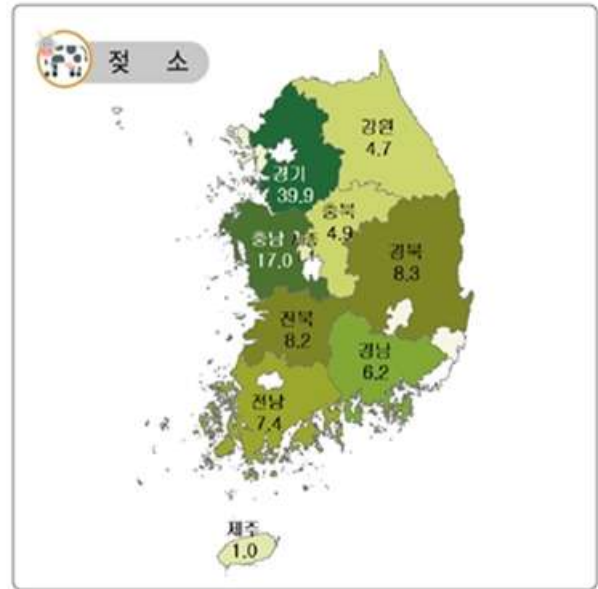
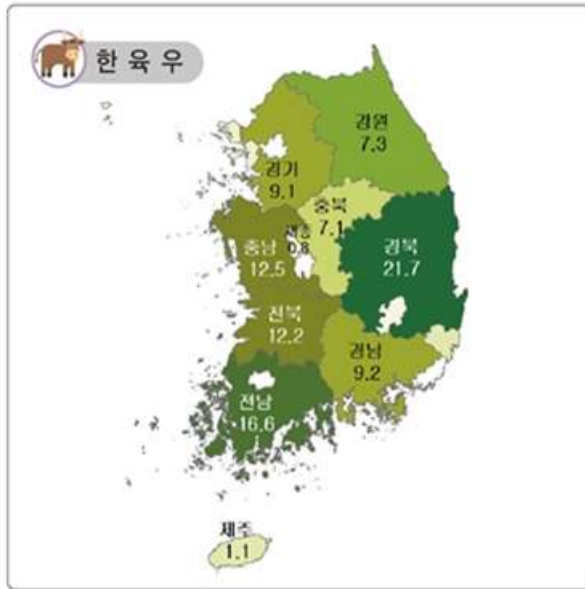


- 국외의 경우, 다양한 야생 반추류에서 BCV가 검출되었으며, 국내의 경우에 고라니에서 BCV가 2018년 처음으로 검출되었음. 이는 현재 BCV가 특정 동물 종에만 국한되어 발생하지 않고 있음을 보여주는 사례라 할 수 있음

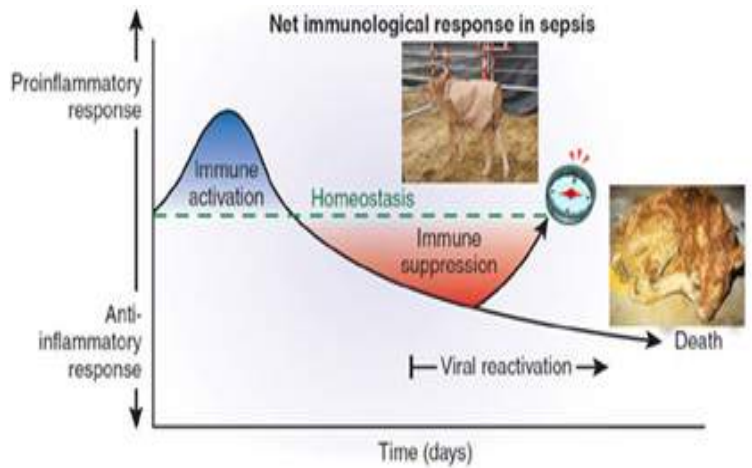


<국외 BCV 검출 동물 종>

- 최근 축사에 접근하는 야생동물이 BCV의 자연숙주(혹은 매개체)로 보고되고 있어, 야생동물 유래 BCV 유입 및 전파차단 연구가 절대적으로 시급한 실정임
- 기후변화 및 국제교역의 증가로 인한 신종 감염병의 출현이 빈번해지고 있는 가운데, 경제(산업)/야생동물 유래 BCV의 재조합으로 인한 신규 인류 재난형 코로나바이러스의 출현이 우려되고 있음
- 2020년 9월1일 가축동향시장 조사에 의하면, 국내 소(한우 및 젃소) 사육두수는 380만 4천수이며, 10만여 농가에서 소를 사육하고 있으며, 전년 대비 4.9% 증가하였으며, 세계 소 사육두수 중 65위를 차지하고 있음



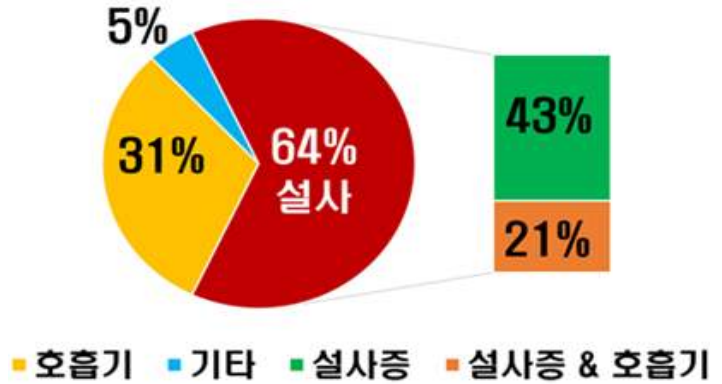
- 국내 축산농가의 규모가 전업화, 기업화, 대형화 등으로 관리인 1인당 관리두수의 증가로 인하여 가축의 세밀한 관리가 어렵기 때문에 질병 발생 가능성이 현저하게 증가되고 있음
- 송아지 설사는 신생송아지 뿐만 아니라 이유 전 송아지에서 높은 빈도로 발생하며, 이로 인한 폐사율은 전체 송아지 폐사율의 50% 이상을 차지하고 있음
- 송아지 설사에 의한 농가의 직접 손실액은 1,205억원, 가축 폐사로 인한 축종별 농가 손실액은 1조 5천억원, 축종별 사육농가의 평균 방역치료비는 2,800억원으로 추산되고 있음.
- BCV는 1개월 미만의 송아지에서는 설사를, 2-6개월령의 송아지에서는 설사를 비롯하여 호흡기 감염, 특히 폐렴을 유발하는 것으로 알려져 있고, 실제 BCV로 인한 농가의 경제적 피해는 훨씬 더 심각함.
- 국내 BCV 관련 연구는 다른 축우 설사증 관련 바이러스 연구에 비해 상대적으로 매우 부족한 실정이며, 무엇보다도 국내에서 출현하고 있는 BCV 유형이 정확히 파악되지 않고 있음
- 이처럼 축산농가에 경제적 손실을 야기하고 있음에도 불구하고 현재 정확한 역학조사가 되어 있지 않은 실정이며, 무엇보다도 BCV에 대한 진단키트 및 백신제조에 대한 기틀이 전혀 마련되어 있지 않음
- 최근 본 연구진의 연구결과에 의하면 현재 송아지에서 검출되는 BCV는 야생동물 유래 bovine-like 코로나바이러스(CoV)와 99.3%-99.6%의 유사도를 보여주고 있어, BCV에 대한



정확한 역학조사를 통해 국내 유행 BCV의 유전형을 파악하는 것이 절대적으로 시급함

- 향후, 인간/경제(산업)동물/야생동물/환경을 통합하여 코로나바이러스의 출현 및 재조합을 감시할 필요성이 강조되고 있기에 경제(산업)·야생동물 유래 *Betacoronavirus*에 대한 선제적 예찰연구가 절대적으로 시급함.

한우 송아지 질병 발생을 현황

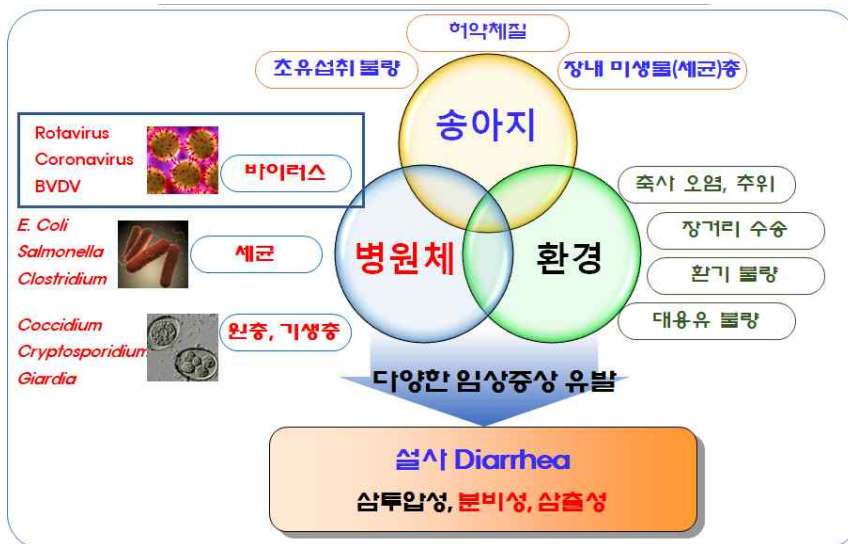


나. 연구개발의 중요성

- 송아지 설사는 농가 수익창출의 주요 저해(-)요인으로 작용

외국의 정상 송아지와 질병 발생 송아지의 폐사율 관리 기준			
송아지 연령	정상시 관리기준	질병시 관리 기준	
		설사병 시	호흡기(폐렴) 시
출생 후, 2개월령 이내	5% 이하	20% 이하	5% 이하
출생 후, 2-6개월령	2% 이하	5% 이하	10% 이하

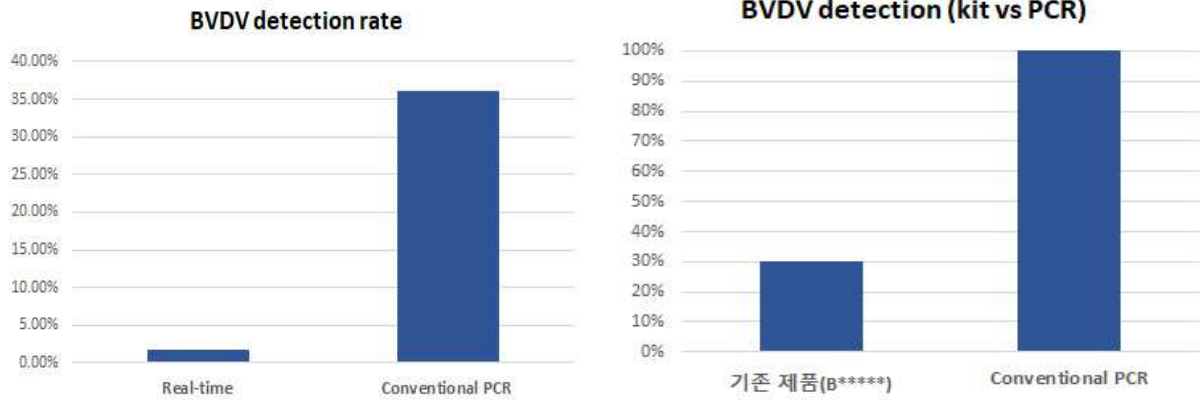
- 송아지 설사증은 여러 요인이 있으나 병원체 중에서도 **바이러스에 의한 설사**가 30일령 이전에 가장 많은 문제를 야기하고 있고 이는 농가소득과 직접적인 관련이 있음.



- 국내에서 시판중인 진단키트(송아지 설사 5종 항원진단키트 등)는 **false-negative/positve** 결과를 제공하고 있는데, 이는 현재 유행하고 있는 유전형과 달라 검사결과가 맞지 않는 문제점이 있음. 이에 보다 정확한 결과를 제공할 수 있는 kit 개발이 시급하고 절실함.
- 농림부 자료에 의하면 BVD로 인한 국내 축산농가의 경제적 손실은 600억~1000억원/연간으로 추산



- BVD로 인한 전 세계적인 경제적 피해규모는
 - ✓ 미국의 경우, 연간 \$1.54~2.59 Billion (\$17-28/head)
 - ✓ 유럽의 경우, 연간 €4.5 million (€137/head)
 - ✓ 모우의 경우, 송아지생산과 관련된 유산, 송아지 폐사, 기형아 출산 등과 관련된 손실 비용은
 - 젖소의 경우: \$199.50/head
 - 육우의 경우: \$174.60/head
- 유럽에서 BCV 항원 진단키트가 시판되고 있으나. 유럽에서 유행하는 BCV와 국내에서 유행하는 BCV의 유전형이 달라 국내에서 사용할 수 없음.
- 콕시듐(*Eimeria* spp.)의 경우는 12가지 이상의 종류가 있으며, 모양이 다양하여 현미경적 관찰을 통해 진단을 하는 것을 원칙으로 하고 있음. 최근 PCR을 이용하여 일부에서 진단을 하고 있으나 *E. bovis*와 *E. zuernii*의 구분이 명확하지 않을 뿐만 아니라 현미경적 검사와 비교 해보았을 때 false negative 결과를 제공하고 있어 PCR 검사의 한계점을 보여주고 있어, 본 연구에서는 현미경적 검사와 PCR 검사를 통해 진단을 할 예정임
- 국내에서 시판되고 있는 BVDV 진단키트로 현재 가장 많이 사용되고 있는 것이 Real-time PCR과 BVDV Ag 검출 키트인데, 현재 시판중인 Real-time PCR kit(○○○○○)는 **false-negative/positive** 결과를 제공하고, 무엇보다도 conventional PCR과 비교해 보았을 때 검사결과가 맞지 않는 문제점과 항원검출 kit 또한 PCR과 비교해 보았을 때 30%만 결과가 일치하여 두 가지 모두 현장에서 적용하기에는 많은 문제점이 있고, 현재 잘못된 결과를 제공하고 있음. 이에 보다 정확한 결과를 제공할 수 있는 키트 개발이 시급하고 절실함.



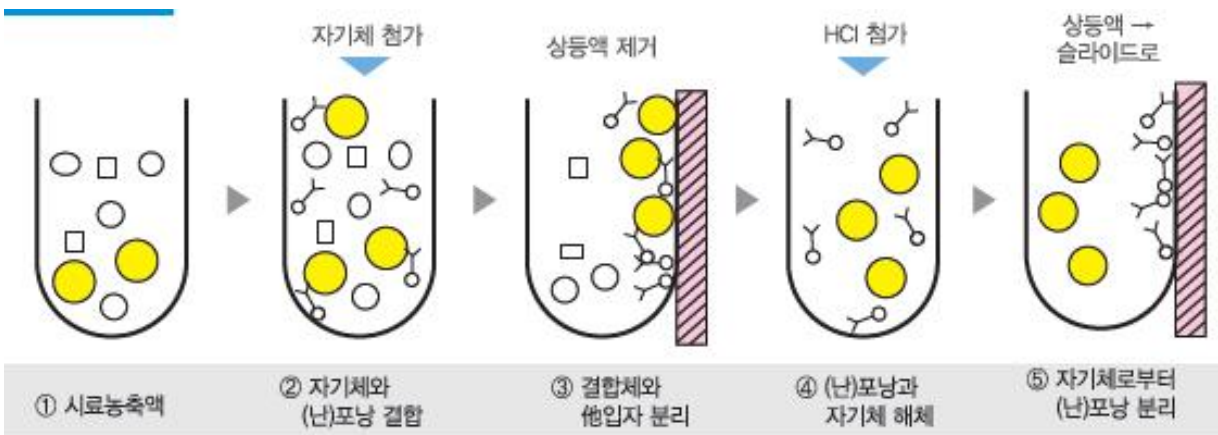
- IDEXX에서 시판중인 BVDV Ag 진단키트가 사용되고 있으나. 이는 혈청(serum)과 귀조직(ear-notch tissue)샘플에만 적용이 가능하여 이외 샘플에서는 적용이 불가능한 문제점을 가지고 있다.
- 국내에서 유행하고 BVDV는 BVDV-1b와 BVDV-2a가 주가 되고 있어, 현 연구에서는 BVDV-1b와 BVDV-2a의 유전형을 이용하여 현장에서 동시에 진단할 수 있도록 할 예정입니다.
- 최근 5년간 송아지 설사분변을 연령과 원인체별로 동정을 실시하여 각각의 양성시료를 이미 확보하고 있을 뿐만 아니라, 다양한 유관기관과의 긴밀한 협조가 진행되고 있으며, 최근에는 장내미생물총(microbiota)의 연구를 수행하고 있어 송아지 설사의 근본적인 대책을 마련할 수 있을 것입니다.
- 또한 이미 확보된 양성시료, 음성시료와 과제 수행 중 확보할 모든 시료를 PCR 검사로 확인하여 양성과 음성 패널을 구축할 예정입니다. 이를 통하여 기존의 IDEXX나 BIONOTE 제품과 대비하여 민감도와 특이도에서 동등 이상의 성능을 갖는 제품을 개발할 것입니다.
- 본 과제를 통하여 개발될 5종 항원신속진단 키트를 통하여 현장시료의 스크리닝 검사를 시행 함으로써 설사병의 원인균 파악 및 교차 감염과 비감염성 설사로 인한 비특이 반응, 낮은 민감도등의 문제의 원인을 확인할 것입니다.
- 본 연구진이 개발하려고 하는 kit는 국내에서 가장 많은 분포를 보이는 유전형을 기반으로 분변 부유액에서 바이러스성 설사를 진단하고자 하며, 소요시간을 10분 이내로 하여 신속하게 항원검사를 하고자 함. 따라서, 국내 실정에 맞는 virus를 이용하여 제작하였으므로 신속하고 정확한(rapid and accurate)것이 본 kit의 가장 큰 장점입니다.

다. 선행연구내용

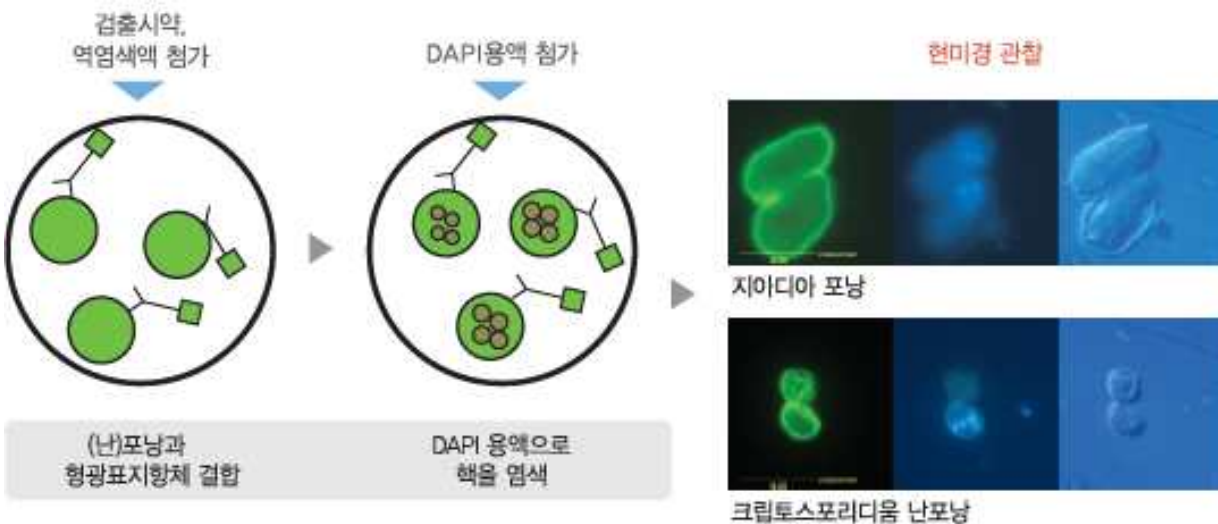
○ 주관 연구기관 ((주)보레다바이오텍)

연구 수행 내용 : 물 중 원생동물 농축을 위한 면역자기분리 정제 키트 개발

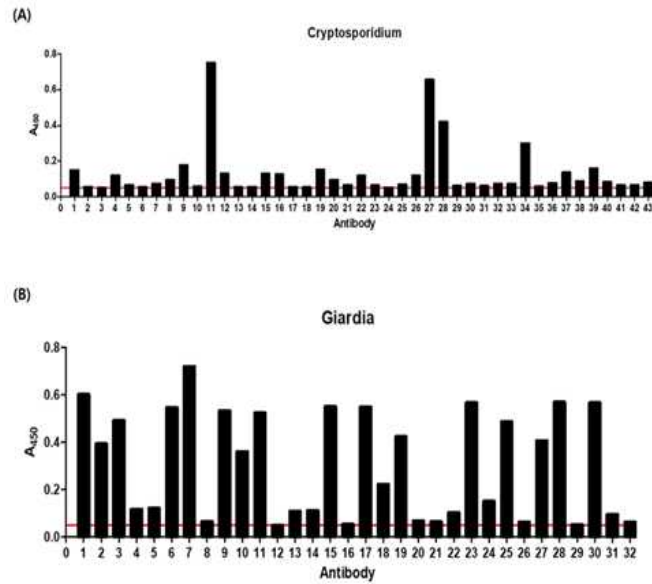
- 본 연구를 통하여 개발된 단클론항체를 이용하여 물속에 지알디아, 크립토스포리디움과 같은 원생동물을 농축하고 형광항체로 염색하여 특정 원생동물을 검출하는 키트를 개발하였다.



<그림 14. 표준시험방법에서 적용된 면역자기분리법 >
(출처 : 국립환경과학원 및 서울시 상수도연구원)



<그림 15. 표준시험방법의 형광항체 염색 및 형광현미경에 의한 관찰 >
(출처 : 국립환경과학원 및 서울시 상수도연구원)



ELISA를 이용한 항원-항체 반응성 평가

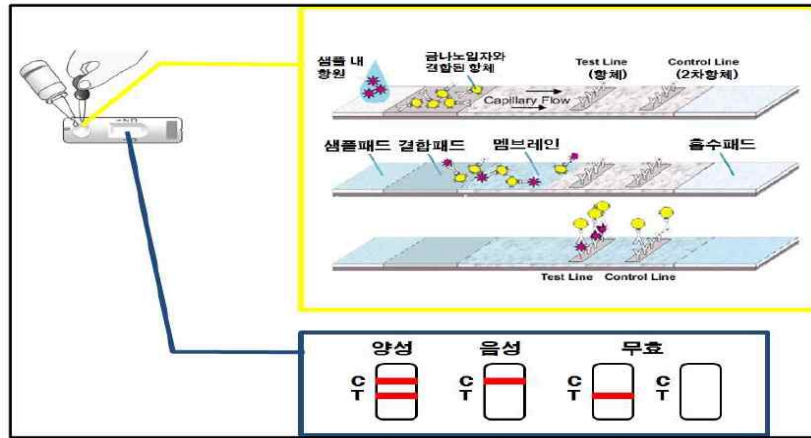
	FITC	DAPI	DIC
Easy stain (BTF)			
G10			
G11			
G12			

항체-FITC 접합조건 확립

연구 수행 내용 : COVID-19 Antigen & Antibody 개발 (자사 연구 개발)

- 본 연구를 통하여 코로나 바이러스의 재조합 Spike RBD protein, Nucleocapsid protein을 *E.coli*와 HEK293 cell에서 발현하여 정제하였으며 그 단백질을 Balb/c 마우스에 면역하여

특이 항체를 개발하여 신속 진단 키트를 개발하였음



[그림] 래피드 키트 원리(출처: 식품의약품안전처)

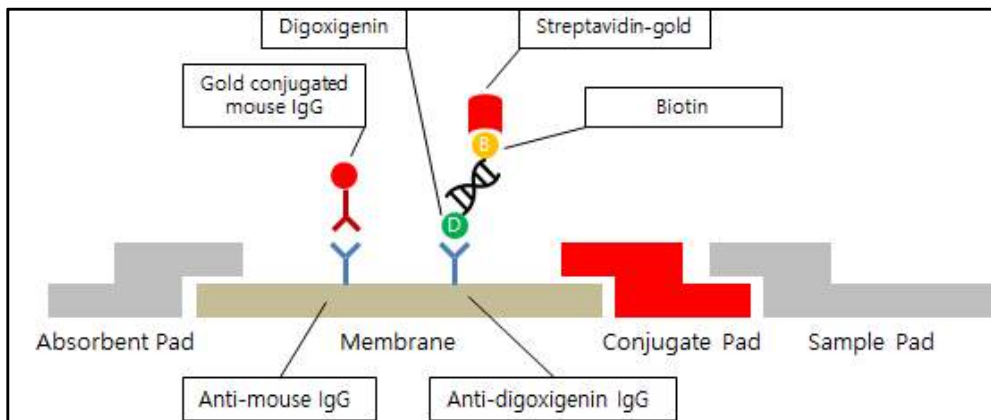
연구 수행 내용 : 농산물에서 식중독바이러스 신속검출법 개발 및 표준화

- 본 연구를 통하여 Rotavirus, Adenovirus, Hepatitis A virus 등에 대한 항체를 개발하였으며 이를 통하여 신속 검출법을 개발하였다.

○ 식중독 바이러스 5종 신속검출 키트 개발

- 전처리 : (기존) 탈리/농축 12-24시간 이상 → (본 연구) 탈리/농축 6-12시간 이내
- 민감도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상
- 특이도 : (기존) 양성반응 90-95% 이내 → (본 연구) 양성반응 95% 이상
- 검출한계 : (기존) 10^2-10^3 cfu/g or mL 이상 → (본 연구) 10^2 cfu/g or mL 이내
- PCR 반응부터 PCR 결과 확인까지 소요 시간 : (기존) 2-4시간 이상 → (본 연구) 1시간 이내
- 진단대상 : 노로바이러스 G1/G2, A형 간염 바이러스, 아데노 바이러스, 로타 바이러스, 아스트로 바이러스
- 적용범위 : 농업용수 및 세척용수의 수질, 토양 및 위생 관리를 위한 미생물 오염 검출 및 안전성 평가

<제품 사용 모식도>



연구 수행 내용 : 고감도 뎅기바이러스 항원, 항체 검출용 Rapid Diagnostic kit 개발

- 본 연구를 통하여 Dengue 바이러스에 대한 항체를 개발하였으며 이를 통하여 신속 검출법을 개발하였다.
- 민감도 : 100% (측정기관 :KTC)
- 특이도 : 100% (측정기관 :KTC)

시 험 결 과

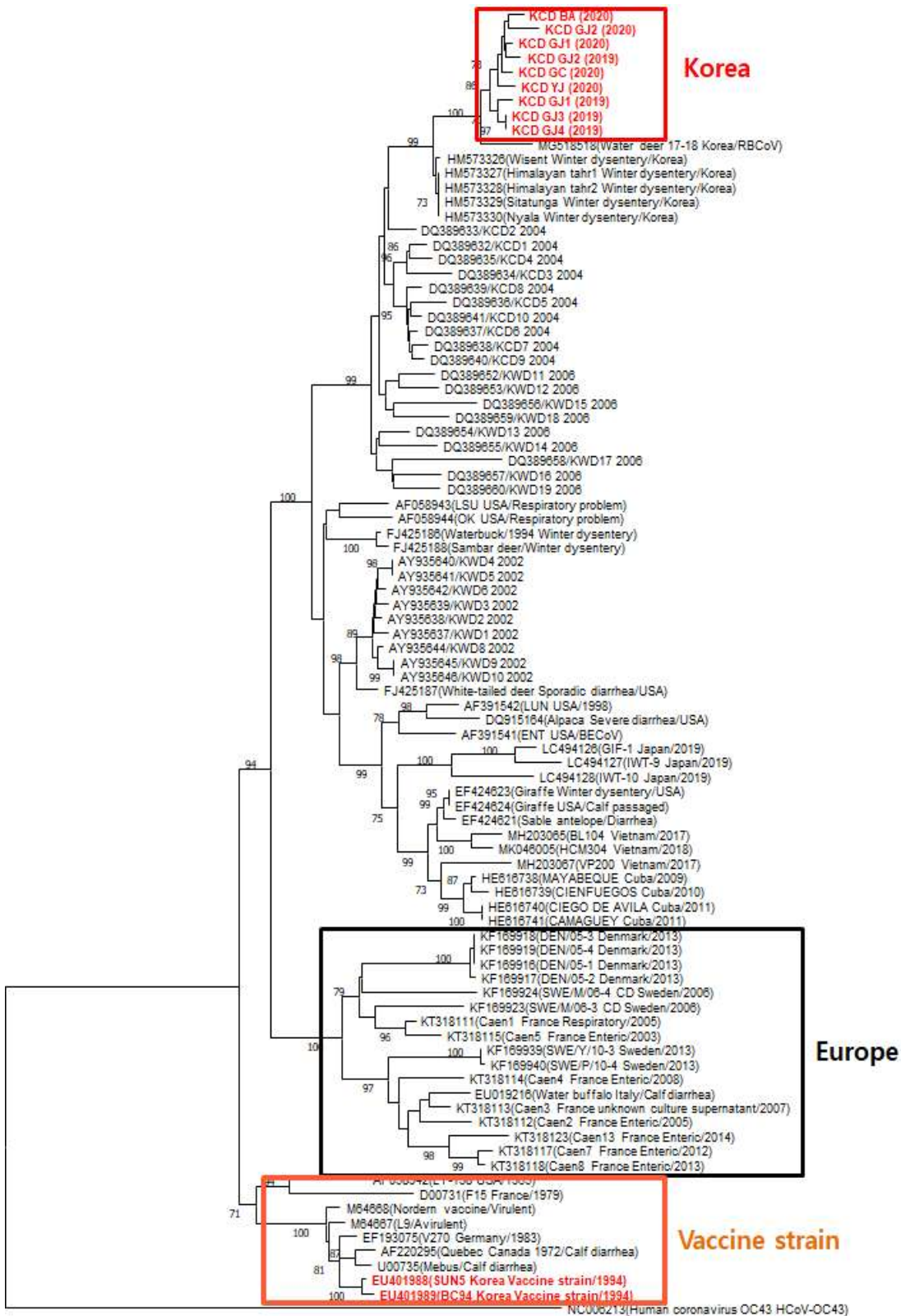
성적서 번호 : T-2018-08962

□ 붙임 :

시험항목	단위	시험기준 및 시험방법	시험 결과	비고
민감도 (Dengue 항원)	%	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 아래의 계산식으로 민감도를 계산한다. - 민감도 = $\frac{\text{진양성}}{(\text{진양성} + \text{위음성})} \times 100$	100	첨부1 참조
특이도 (Dengue 항원)	%	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 아래의 계산식으로 특이도를 계산한다. - 특이도 = $\frac{\text{진음성}}{(\text{진음성} + \text{위양성})} \times 100$	100	첨부2 참조
반응시간 (Dengue 항원)	분	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 밴드가 관찰되는 시간을 측정한다,	결과참조	첨부3 참조
민감도 (Dengue 항체)	%	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 아래의 계산식으로 민감도를 계산한다. - 민감도 = $\frac{\text{진양성}}{(\text{진양성} + \text{위음성})} \times 100$	100	첨부4 참조
특이도 (Dengue 항체)	%	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 아래의 계산식으로 특이도를 계산한다. - 특이도 = $\frac{\text{진음성}}{(\text{진음성} + \text{위양성})} \times 100$	100	첨부5 참조
반응시간 (Dengue 항체)	분	20 개의 양성 및 음성 시료 100 μL를 키트에 떨어뜨린 후, 5 ~ 15 분간 반응시켜 양성 및 음성으로 나타나는지 확인하고 밴드가 관찰되는 시간을 측정한다,	결과참조	첨부6 참조

○ 제 1협동기관 (경북대학교)

본 연구진은 2016년부터 BCV에 대한 역학조사를 통해 국내에서 유행하는 유전형을 찾아내어 국내에서 유일하게 야외분리주를 확보하였음.



<계통발생분석>

- 2017년부터 2019년까지, 1~60일령의 689두 송아지를 대상으로 정상 및 설사 분변에서 송아지설사와 관련된 병원체를 조사한 결과, BCV와 로타바이러스(BRV)가 송아지 설사와 밀접하게 연관이 있었음이 확인하였음.

Pathogen	No. (%) of positives among diarrhetic calves (n=329)	No. (%) of positives among normal calves (n=360)	P value	Total (n=689)
BCoV	24 (7.3%)	13 (3.6%)	0.032	37 (5.4%)
BNoV	39 (11.9%)	45 (12.5%)	0.796	84 (12.2%)
BoRVA	11 (3.3%)	2 (0.6%)	0.007	13 (1.9%)
BToV	8 (2.4%)	7 (1.9%)	0.662	15 (2.2%)
BVDV	41 (12.5%)	68 (18.9%)	0.201	109 (15.8%)
<i>E. coli</i>	178 (54.1%)	210 (58.3%)	0.264	388 (56.3%)

- BCV는 연변(loose feces) 상태의 분변에서 가장 많이 검출되었으며, 무엇보다도 BCV는 BVDV와의 혼합감염을 초래함을 알 수 있었음.

Pathogen(s)	Semi-formed		Loose		Watery	
	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)
BCoV (Total)	0.51	1.3 (0.6-3.0)	0.03	2.9 (1.1-7.6)	0.77	1.3 (0.3-5.7)
BRV (Total)	1.00	-	1.00	-	-	-
BVDV (Total)	0.50	1.3 (0.6-2.9)	0.48	0.48, 1.4 (0.5-3.7)	0.98	1.0 (0.2-4.1)
BCoV + BRV	1.00	-	1.00	-	-	-
BCoV + BVDV	0.17	2.2 (0.7-6.8)	0.04	3.6 (1.0-12.4)	0.91	1.1 (0.1-10.9)
BCoV + BRV + BVDV	1.00	-	1.00	-	-	-

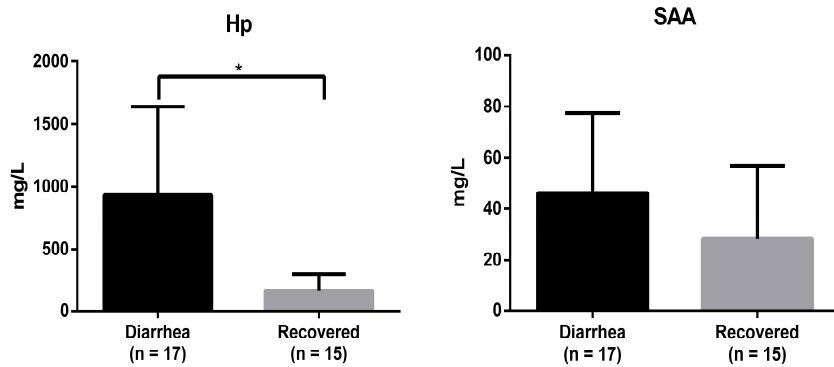
- BCV 감염은 로타바이러스에 비해 10일령에서 가장 높은 발생률을 보였으며, 이유 전 송아지에서 연령과 상관없이 고르게 발생함을 알 수 있었음.

Age (days)	BCV	BRV
1-10 (n=140)	10 (7.1%)	5 (3.6%)
11-20 (n=197)	9 (4.6%)	5 (2.5%)
21-30 d (n=129)	7 (5.4%)	3 (2.3%)
31-40 d (n=89)	5 (5.6%)	0
41-50 d (n=79)	4 (5.1%)	0
51-60 d (n=55)	2 (3.6%)	0
Total	37 (5.4%)	13 (1.9%)

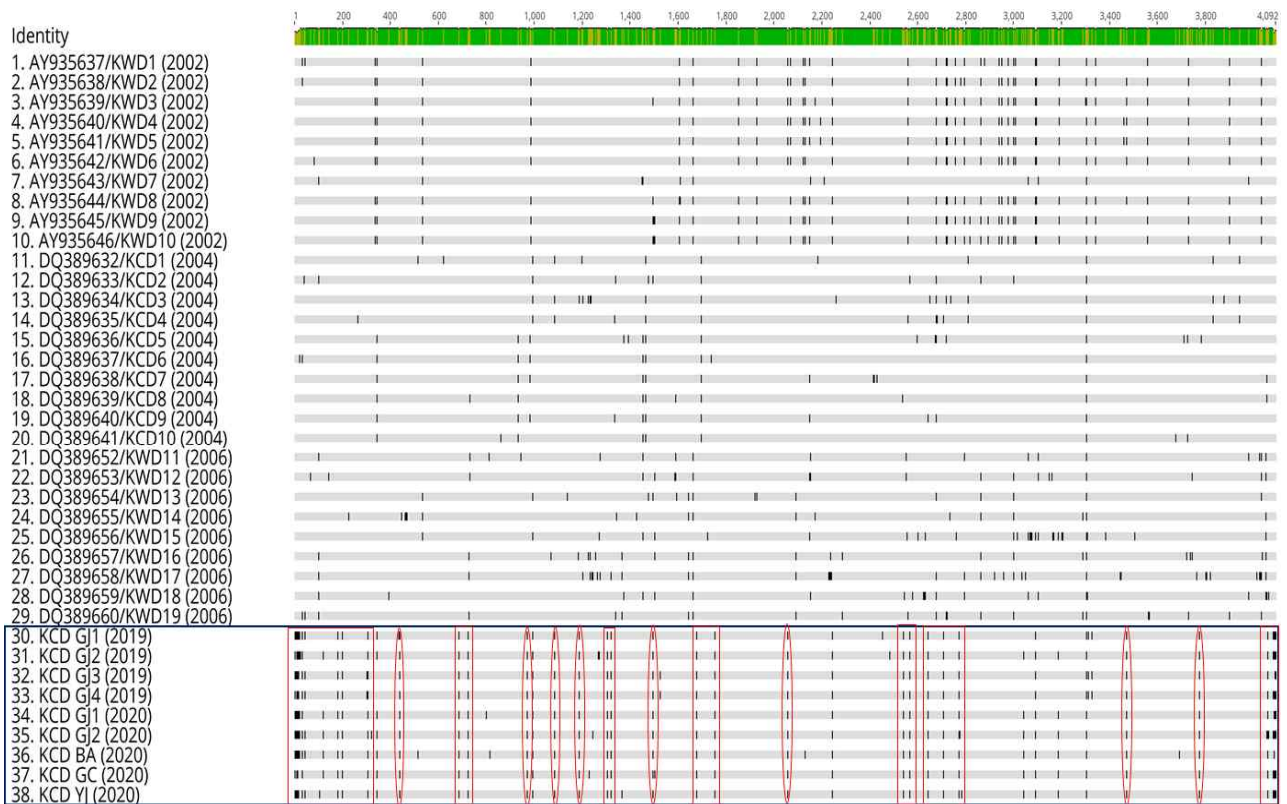
- 또한 BCV가 감염된 송아지는 BCV에 회복된 송아지와 비교해보았을 때, 염증 지표인 Haptoglobin이 현저하게 증가함이 본 연구진에 의해 확인되었고, 이는 아마도 BCV 감염

을 예측할 수 있는 지표로 사용될 수 있는 가능성을 제시함.

- 국내에서 BCV는 2006년까지 활발하게 연구가 진행되었으나 2006년 이후로의 연구결과는 전무함. 본 연구진이 2019년부터 현재까지 양성가검물을 대상으로 BCV의 염기서열분석



석 (full genome sequence)을 진행하여 2006년 이전 국내에서 검출된 유전형(KCD와 KWD)과 비교분석을 실시한 결과, 현재 국내에서 검출되는 유전형은 2006년 이전과는 현저한 차이가 있음이 관찰되었으며 genetic variation이 상당히 많이 진행되고 있음이 확인되었음(아래 그림참조).

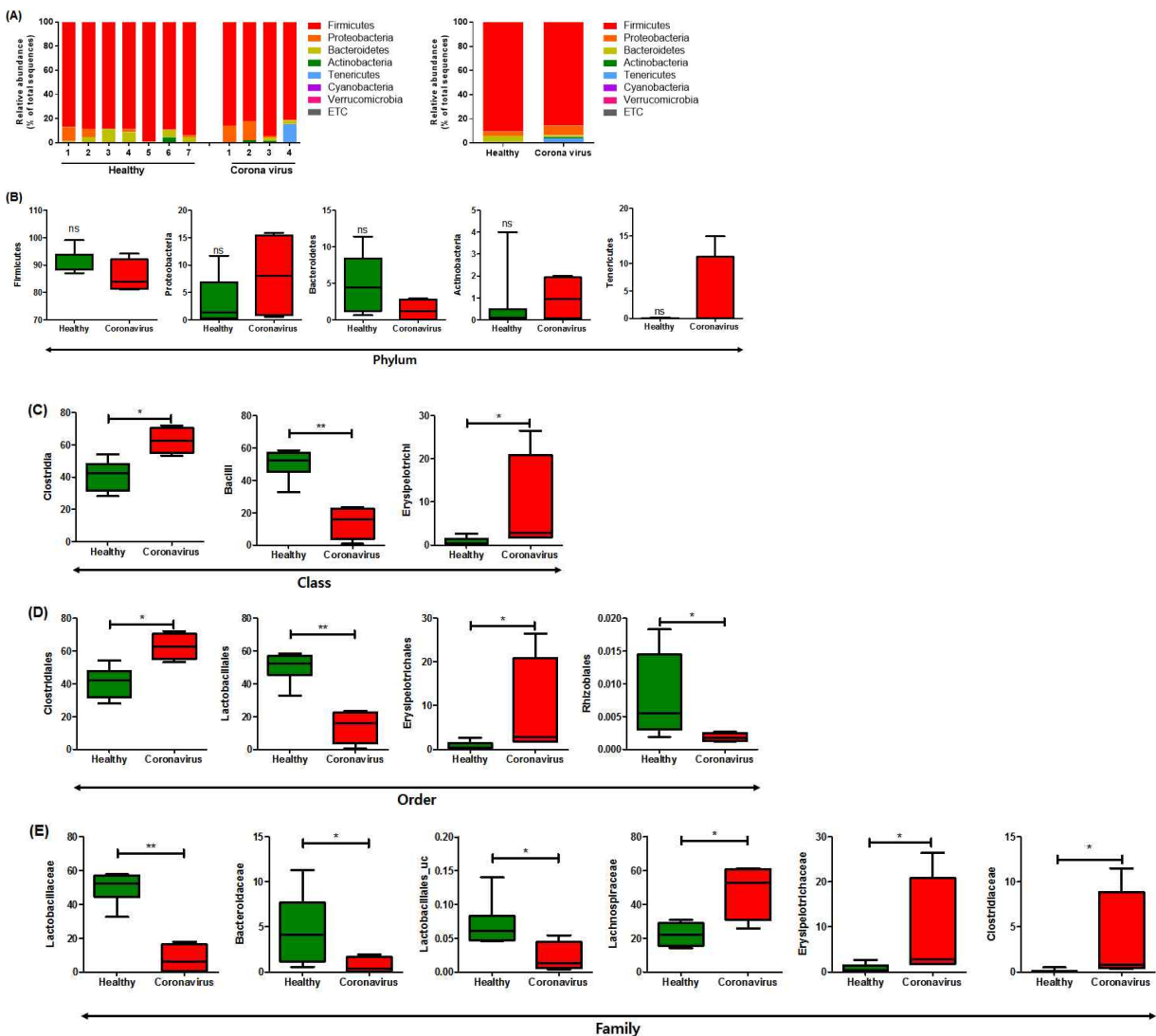


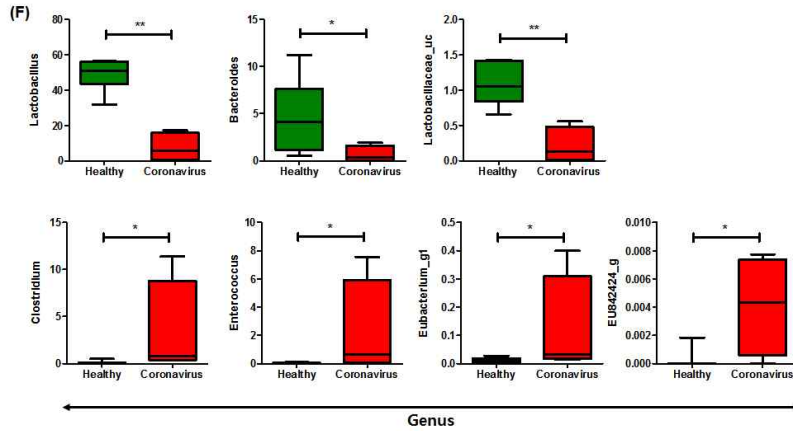
BCoV genetic variations among Korean BCoV isolates

○ 제2 협동기관 (전북대학교)

연구 수행 내용 : “Gut Microbiome 조절을 통한 한우 송아지 설사증의 예방 및 관리”법 개발

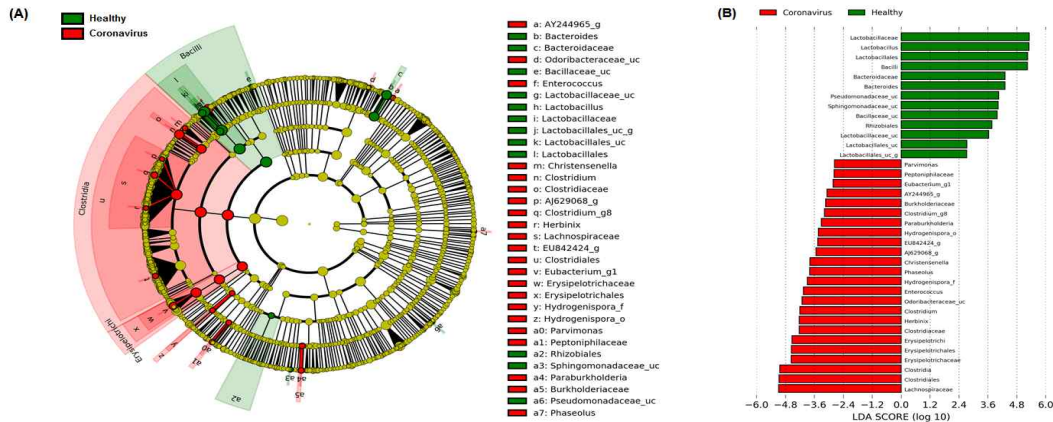
- **Taxonomic composition 분석** : 일령 변화에 따른 정상 송아지의 미생물 군집 변화를 phylum 수준에서 분석하였을 때[그림 6(A)], 총 22 phyla가 동정되었음. Phylum 수준에서 Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria가 84% 이상을 차지하였으며, 유의적인 차이는 보이지 않음[그림 6(B)]. **Coronavirus** 감염에 의한 설사증 발생에 따라 Class 수준에서 Clostridia 증가, Bacilli 및 Erysipelotrichi 증가[그림 6(C)], Order 수준에서 Clostridiales, Erysipelotrichales의 증가 및 Lactobacillales, Rhizobiales 감소를 확인함[그림 6(D)]. Family 수준에서 Lactobacillaceae, Bacteroidaceae, Lactobacillales_uc 감소 및 Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, Clostridiaceae 증가를 확인함[그림 6(E)]. Genus 수준에서 3종 감소(*Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Lactobacillaceae_uc*), 4종 증가(*Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium_g1*, *EU842424_g*)를 확인함[그림 6(F)].





정상 송아지와 Coronavirus 감염에 의하여 설사가 유발된 송아지의 주요 Taxonomic composition 분석. (A) 분변 내 Phylum 수준에서의 개체별 및 평균 미생물군집 분포, (B) Phylum, (C) Class, (D) Order, (E) Family, (F) Genus 수준에서의 미생물군집 분석

- **LEfSe 분석** : LEfSe 분석을 기반으로 하여 caldogram을 나타낸 결과, **Coronavirus** 설사 증 발생에 따라 정상 송아지에서 Bacteria와 설사증 송아지의 Clostridia, Erysipelotrichi 감소와 관련성이 있음[그림 7(A)]. 또한 *Clostridium*, *Enterococcus*를 포함한 4 genus는 설사증 송아지와 유의한 관련성을 보임[그림 7(B)]

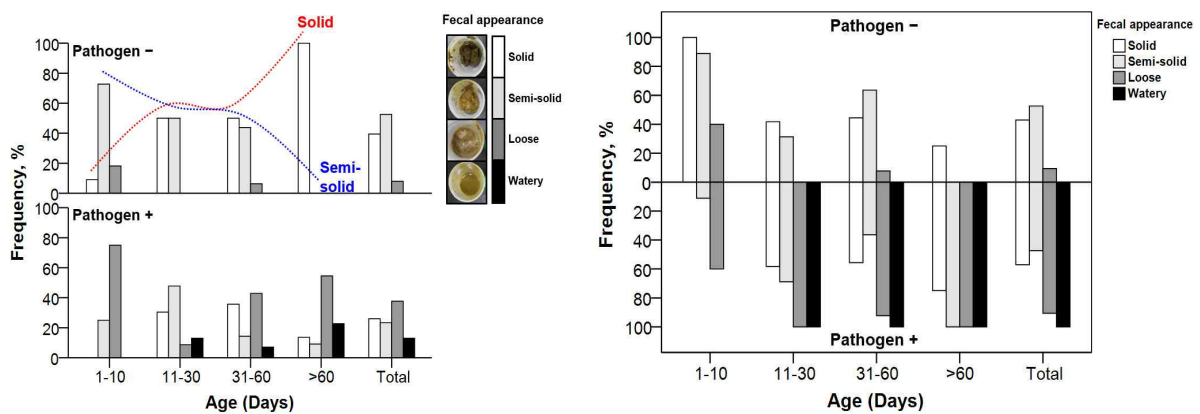


정상 송아지와 Coronavirus 감염에 의하여 설사가 유발된 송아지의 주요 Taxonomic composition 분석 (Genus 수준). (A) Genus 수준에서 Caldogram 분석, (B) Genus 수준에서 LDA 수치 분석

- **Coronavirus**는 소장의 용모 상피 세포에 증식하며 소장의 흡수력 저하로 인해 설사증세를 보이며 주요 감염 경로는 **Coronavirus**에 감염된 소의 분변으로 알려짐. **Coronavirus**의 감염으로 인한 설사증 발생 시, 장내 미생물 구조 변화를 일으키게 되며, 특히 소장에서 증식된 병원성 미생물이 분변으로 배설되면서 추가적인 감염에 영향을 미치는 것으로 사료됨.
- ☞ 위의 내용들은 본 연구자가 산업동물 분야에서 수행한 연구 결과들로서, 이번에 수행하고자 하는 연구와 밀접한 관련이 있는 선행 연구 성과들임. 그리고 최근 5년간 40편이상의 논문을 게재한 바 있기 때문에 연구 수행역량도 충분히 지녔다고 생각됨.

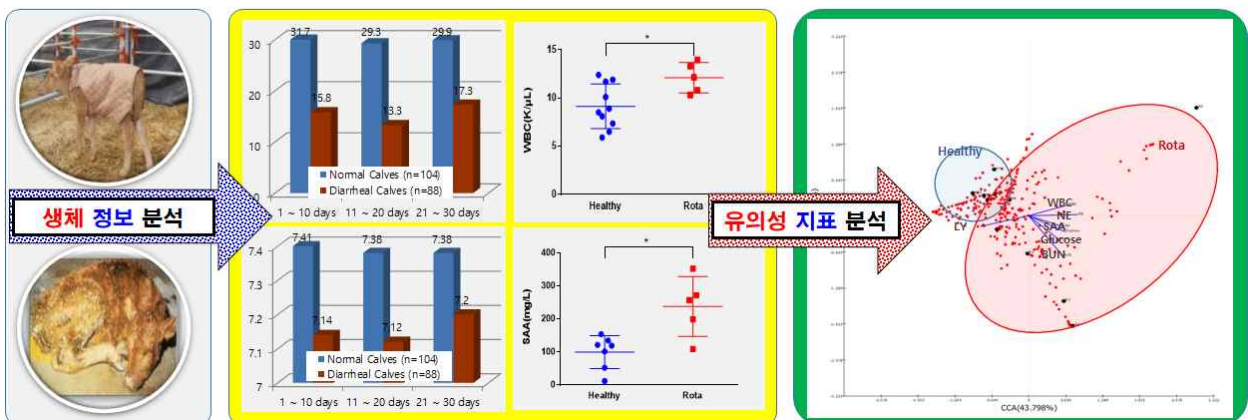
연구 수행 내용 : 축산농가 송아지 설사증 생체정보 분석 및 조기감별/치료(관리)법 개발
 본 연구를 통하여, 국내 한우 송아지의 설사병 발생 양상 분석 및 설사에 의한 생체 변화 및 내인성 인자를 조사하여 설사병 조기 판단을 위한 지표 수립, 송아지 설사증의 효과적인 치료 및 관리법 제시의 연구 성과를 얻을 수 있었음. 특히, 정상 및 설사증 송아지의 성장에 따른 생체 정보와 설사증 송아지의 내인성 인자들의 자료를 국내 최초로 얻을 수 있었으며, 이를 통하여 “축산농가 송아지 설사증 생체정보 분석 및 조기감별/치료(관리)법 개발”에 주요 지표 및 자료를 제공할 수 있었음.

- 보다 세부적으로는 생후일령과 분변상태와의 연관성, 생후일령별 분변상태와 Pathogen 검출과의 연관성, 분변상태에 따른 병원체 감염율 비교분석 등을 통한 “분변의 성상을 통한 설사증의 기준을 확립”하였으며, 설사 유무에 따른 병원체 감염율 비교분석, 설사 발병에 관련된 병원체 분석, 설사 병원체에 따른 설사 송아지에 대한 연령별 분포, 병원체 양과 설사증 발병과의 연관성 등을 분석함으로써 “송아지 설사와 관련된 생리지표를 개발”하였음.



- 정상 및 설사증 송아지의 연령별 RBC, WBC, Serum Chemistry profiles 분석과 주요 Mineral 및 Base Excess/Anion Gap/pH 등의 분석, 그리고 송아지의 면역능 파악에 활용될 Serum Protein 및 Globulin 각각의 분획치 분석, 예후 지표로 활용될 Acute Phase Protein 분석을 통하여 “연령(~ 1개월)에 따른 정상 및 설사증 송아지의 내인성 인자 변화상 분석”을 수행하였음.

설사증 송아지들의 주요 생체정보 변화상 파악 및 유의성/연관성 지표 분석



2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 연구개발과제의 목표 및 수행과정

(1) 연구개발과제의 최종 목표

- 송아지 바이러스 설사증 진단 kit 개발을 위한 후보물질 발굴을 통해 현장에서 신속하게 진단할 수 있는 항원 진단 시제품 개발

(2) 연구개발과제의 수행과정

가.

- 설사증 송아지의 역학조사를 통한 설사바이러스의 유전적 특성분석
 - 설사증 송아지의 분변을 이용하여 코로나바이러스(BCV), 로타바이러스 분석
 - 역학 조사를 통하여 진단된 각각의 바이러스 및 지알디아의 유전적 특성 분석
 - 연령에 따른 송아지 설사 원인체 파악
- 설사증 송아지로부터 바이러스 분리
 - 소 코로나바이러스, 소 로타바이러스, 소 바이러스 설사 바이러스의 분리 및 배양
 - 각 바이러스의 핵산 추출
 - 항 항체 제작
- 송아지 설사증 진단용 키트 개발
 - 원인체별 PCR 검사와 개발 키트와의 결과 비교
 - 개발 키트의 유의성 평가 및 임상적용 평가

나. 연구개발과제의 내용

(1) 설사증 송아지의 역학조사를 통한 설사바이러스의 유전적 특성분석

○ 소 설사증 검체 수집

본 연구 수행을 위해 국내 대형 축산농가 및 각 도 지역의 동물위생시험소를 중심으로 분변, 혈청 및 혈액 샘플 등 가검물을 수집하였다. 총 858개의 분변 시료와 90개의 혈액 그리고 3,880개의 혈청 시료를 수집하였다.

○ 소 설사증 검체들로부터 핵산 분리

이들 가검물로부터 송아지 설사증의 원인체인 *Giardia*, BVDV, BRV 및 BCV에 대한 조사를 진행하기 위해 총 4,828개의 분변, 혈액, 혈청 시료로부터 RNA 및 DNA를 추출하였으며, 각 병원체 특이적인 primer set을 이용한 RT-PCR과 real-time PCR을 실시하여 각 검체 시료들에 있어 병원체 감염여부를 분석하였다. 858 분변시료는 *Giardia*, BVDV, BRV, BCV 감염분석에 사용하였으며, 3,970 혈액 및 혈청시료는 BVDV 감염을 분석하는데 사용하였다.

○ 소 설사증 병원체 감염 상 분석

분변을 이용한 분석에 의하면 총 858 가검물 중 3.3%가 *Giardia*에 감염되었으며, 9%가 BCV, 11.1%가 BVDV 그리고 53.3%가 BRV에 감염된 것으로 드러났다. 또한, 3970 혈액 및 혈청 검체에서는 36.2 %가 BVDV에 감염된 것으로 나타났다. 그 검사결과는 아래와 같다.

- 분변: *Giardia*가 28건 (3.3%), BVDV가 95건 (11.1%), BRV가 457건 (53.3%), BCV가 77건 (9.0%)이 검출되었음
- 혈액과 혈청: BVDV 검출에만 사용되었으며, BVDV는 혈액에서 65.6% (59/90), 혈청에서 35.5% (1378/3880)의 유병률을 보였음

<설사병 유발 병원체별 국내 유병률>

검체 종류	총 검체 수	<i>Giardia</i> (%)	BVDV (%)	BRV (%)	BCV (%)
분변	858	28 (3.3)	95 (11.1)	457 (53.3)	77 (9.0)
혈액	90	-	59 (65.6)	-	-
혈청	3,880	-	1,378 (35.5)	-	-

○ 소 설사증 병원체의 유전형 분석

상기 분석결과를 바탕으로 양성반응을 보인 시료를 바탕으로 염기서열분석을 통한 각 병원체의 유전형 분석을 실시하였다.

- BRV 양성 시료의 경우 VP7 (G 유전형)과 VP4 (P 유전형) 유전자에 대한 염기서열분석을 통해 국내에서 발생하는 유전형을 조사하였다. 총 457개 중 196개의 분변이 BRV에 양성이었으며, 이들을 대상으로 염기서열분석을 진행하였다. 본 연구결과에 의하면

G6P[5]가 가장 많이 검출되었으며, G8P[5], G6P[11] 및 G10P[11] 순으로 검출되었다. 또한, 돼지에서 주로 검출되는 G5P[7]이 설사하는 송아지에서 검출되었다.

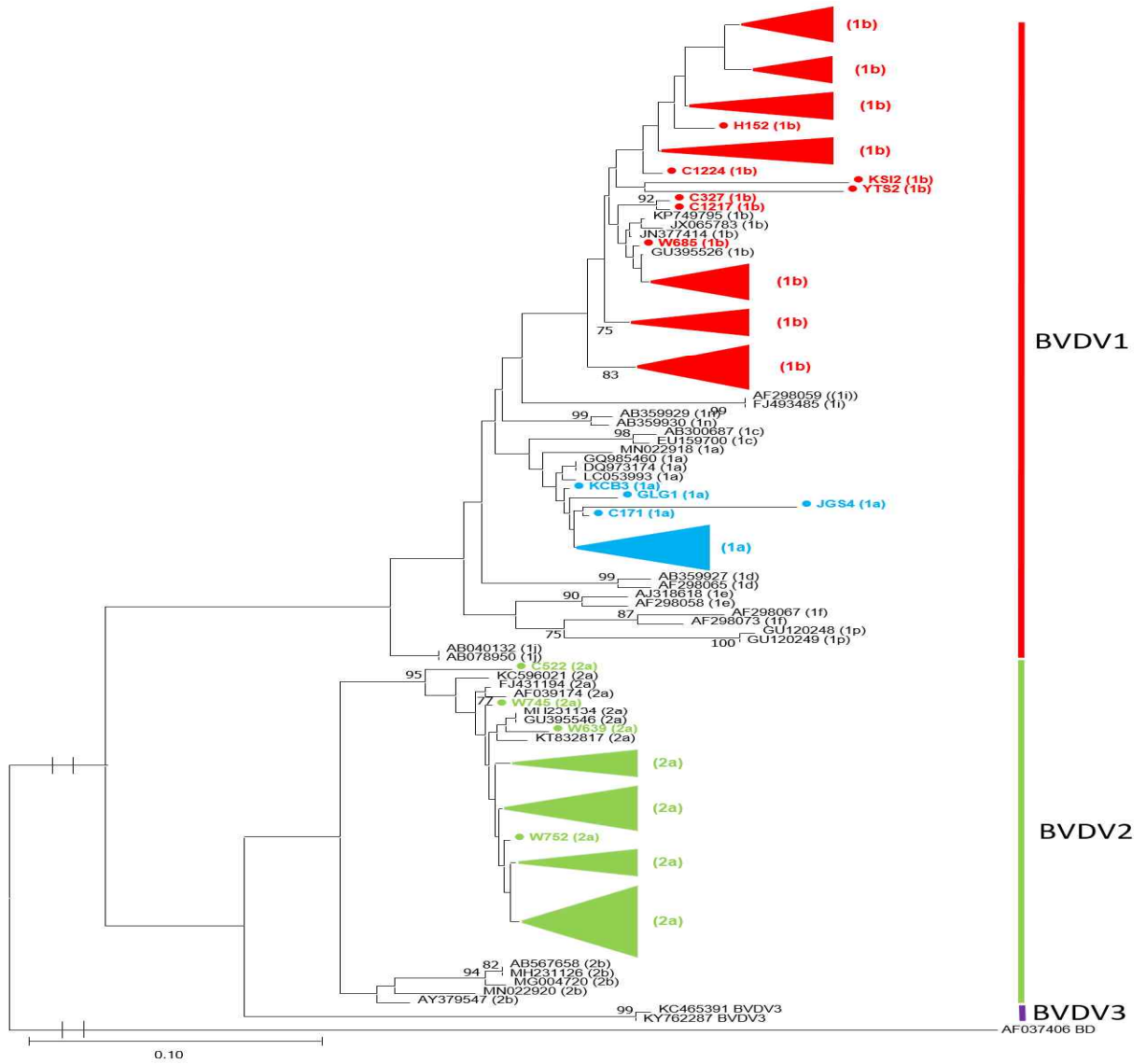
<BRV 유전형 분석>

유전형	G5P[7]	G6P[1]	G6P[5]	G6P[11]	G8P[5]	G10P[11]
양성	1	1	51	4	7	3

- BVDV의 검출은 먼저 real-time RT-PCR을 실시하여 Ct 값 29 미만을 양성으로 판단하였고, 이들 양성샘플에서 5' -UTR 유전자를 이용하여 증폭한 후 염기서열분석을 진행하였으며 국내에서 유행하는 유전형을 확인하였다. 본 연구결과에 의하면 BVDV-1b가 국내에서 가장 많은 발생을 보이는 것으로 확인되었음

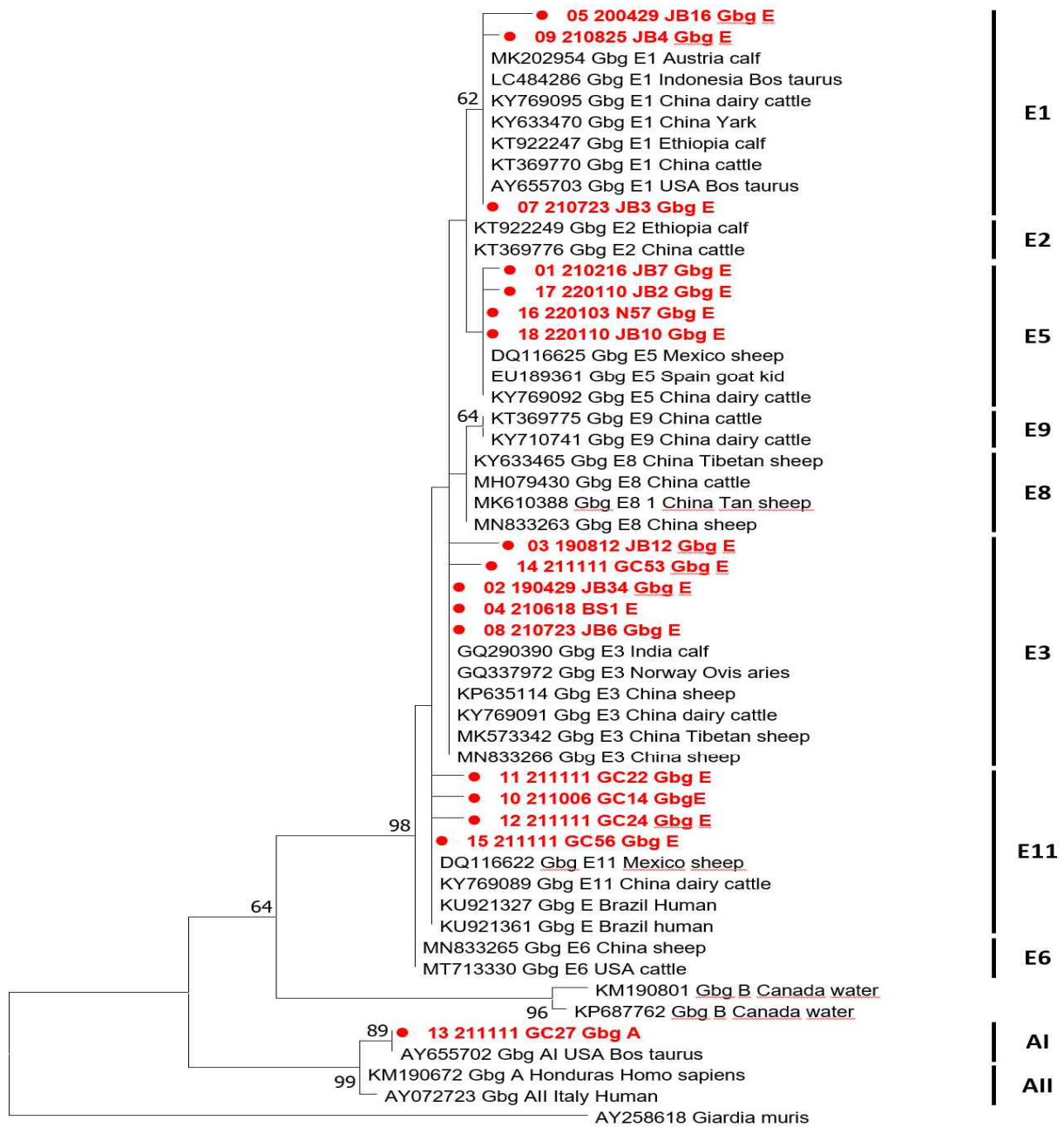
<BVDV 유전형 분석>

BVDV 양성 시료	BVDV-1a	BVDV-1b	BVDV-2a
80	15	38	27



<BVDV 계통발생도>

- *Giardia*는 β -giardin 유전자를 이용하여 검출하였으며, 28개가 양성이었음. 이들 중 27개는 assemblage E, 1개만 zoonotic인 assemblage A였다. 국내 송아지에서는 assemblage E가 주로 검출되는 것으로 확인되었다.

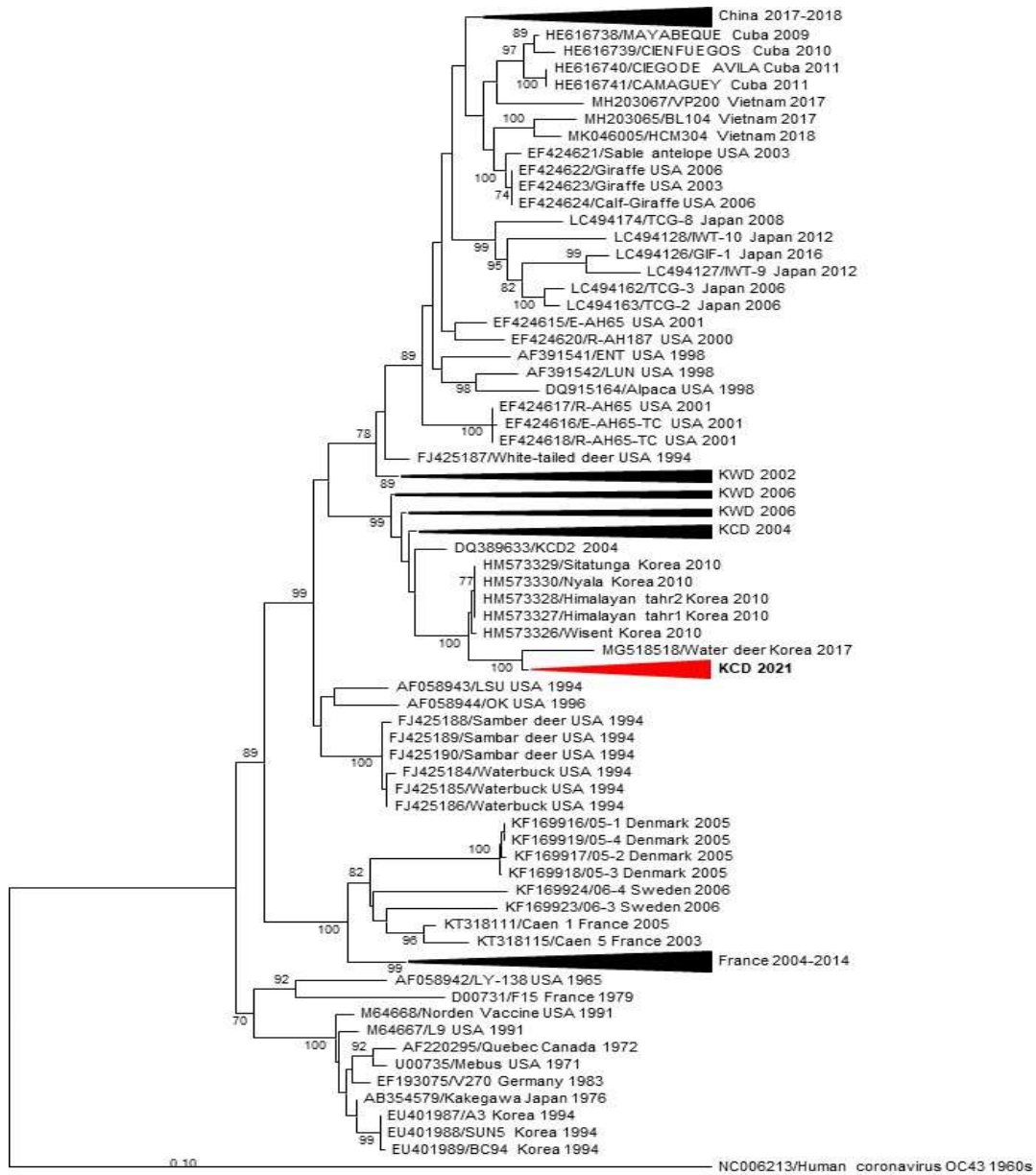


<Giardia 계통발생도>

- BCV는 77개의 분변에서 검출되었으며, 본 연구에서 밝혀진 염기서열분석결과에 의하면 과거 국내에서 보고된 것들과는 유전적으로 차이가 있는 것으로 밝혀졌으며, 이는 계통 발생도 분석에서도 또한 확인되었다.

<S gene의 homology 분석>

BCV sequences	nucleotide (%)	amino acid (%)
2021 variants	98.9-99.6	98.5-99.5
2002 Korean winter dysentery (KWD)	97.5-98.7	98.1-99.2
2004 Korean calf diarrhea (KCD)	98.0-98.9	98.2-99.4
2006 KWD	97.5-98.7	97.1-99.2



<BCV 계통발생분석>

○ 소 설사증 병원체의 국내 감염 실태 및 문제점

- 특히, 최근 국내에서 검출된 BCV는 현재 상용되고 있는 백신 균주와는 현저한 차이를 보여주었음. 본 연구결과를 토대로 국내 유전자형에 맞는 백신 균주의 교체가 시급함에 대해 정책제안을 하였음
 - 2005년 백신 균주와는 98.2-99.2%,
 - 2008년 백신 균주와는 96.3-97.1%의 유사도를 나타내었음
- 설사와 관련 있는 콕시듐은 12가지 종으로 분류되는데, 진단을 위해서는 육안으로 충란을 확인하는 것이 보다 정확한 방법이나, 본 연구에서는 병원성과 관련 있는 세 가지 종, *Eimeria bovis*, *E. zuernii* 및 *E. auburnensis* 만을 PCR을 이용하여 검출하였음. 육안검사보다 PCR을 이용했을 때 진단율이 현저하게 낮았지만, 본 연구에서는 *E. zuernii*, *E. auburnensis*, 순으로 검출되었으며, *E. bovis*가 가장 검출율이 낮았음을 알 수 있다.

총 샘플 수(n=601)	<i>Eimeria bovis</i>	<i>E. zuernii</i>	<i>E. auburnensis</i>
양성 샘플 수	2 (0.3%)	35 (6.0%)	25 (4.2%)

- 따라서 좀더 효율적인 콕시듐을 진단을 위해서는 콕시듐 특이적인 항원 및 항체단백질을 이용한 신속진단키트의 개발이 필요할 것으로 여겨진다.
-

(2) 설사증 유발 병원체 다중 진단키트의 개발을 위한 항원 항체 단백질의 개발

○ 소 설사병 병원체 항원단백질 유전자의 선발

소 설사병 유발 병원체를 효과적으로 진단하기 위해 다양한 문헌조사를 실시하였다. 이를 바탕으로 각 병원체에 대한 최적의 목적단백질을 선정하였으며, 설사병 병원체 중 BCV의 진단을 위해서는 BCV nucleocapsid protein (NP), BVDV 진단을 위해서는 외피 당단백질의 하나인 BVDV Erns 그리고 BRV의 진단을 위해서 중심 핵 바이러스 단백질 (core viral protein)중 하나인 BRV-VP6가 각각 최종 선정되었다. 이들 목적단백질의 대한 유전정보는 유전자 데이터베이스(NCBI, MD, USA)를 분석하여 병원체 바이러스의 유전자 정보를 확보하였으며, 확보된 유전자 정보를 바탕으로 병원체 목적 단백질의 재조합 항원단백질 유전자 크로닝을 위한 유전자 염기서열을 디자인하였다.

- BCV의 NP 단백질을 암호화하는 NP 유전자 cloning은 NCBI (MD, USA)에서 확보한 염기서열 정보 (AF058944.1)를 바탕으로 제작된 특이적인 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR 방법을 통해 BCV 감염세포 추출물에서 직접 cloning하였다. BCV가 감염된 조직세포의 추출물에서 Viral Gene Spin kit (Intronbiotech co.)를 이용하여 BCV RNA를 추출하였다. CyscleScript Reverse Transcriptase (Bioneer Co.)를 이용하여 이들 BCV RNA로 부터 cDNA를 합성한 후, 도식1의 특이적 primer set을 이용한 RT-PCR을 통해 BCV-NP 유전자를 cloning 하였다. 이들 선발된 유전자는 염기서열 비교분석을 통해 동정한 후 재조합

단백질의 생산을 위한 대장균 발현 vector에 최종cloning하였다.

A

>BCV-NP Nucleic acid sequences
 ATGTCCTTTTACTCCTGGTAAGCAATCCAGTAGTAGAGCGTCCCTGGAATCGTTCTGGTAATGGCATCCCTAAGTGGGCCGATCAGTCCGA
 CCAATCTAGAAATGTTCAAACCCAGGGGTAGAAGAGCTCAACCCAAGCAAACTGCTACTTCTCAGCAACCATCAGGAGGGAATGTTGTACC
 TACTATTTCTGGTTCTCTGGAATTAAGTCTCAGTTTCAAAGGGAAAGGAGTTTGAATTTGCAGAGGGACAAGGTGTGCCATTGCACCAGGAGT
 CCCAGCTACTGAAGCTAAGGGGTACTGGTACAGACACAACAGACGTTCCCTTTAAACAGCCGATGGCAACCCAGCGTCAATTGCTGCCACGA
 TGGTATTTTACTATCTTGGAACAGGACCGCATGCCAAAGACCAGTATGGCACCAGCATTTGACGGAGTCTTCTGGGTGCGTAGTAACAGGCG
 TGATGTCAATACCCCGGCTGACATTCTCGATCGGGACCCAAGTAGCGATGAGGCTATTCCGACTAGGTTTCCGCTGGCACGGTACTCCCT
 CAGGGTTACTATAATTGAAGGCTCAGGAAGGCTGCTCC TAATTCAGATCTACTTCACGCGCATCCAGTAGAGCCTCTAGTGCAGGATCGCG
 CAGTAGAGCCAATTCGGCAATAGAACCCTACCTCTGGTGAACACCTGATATGGCTGATCAAAATTGCTAGTCTTTGTTCTGGCAAACCTTG
 GCAAGGATGCCACTAAGCCACAGCAAGTAAC TAAGCAGACTGCCAAAGAAATCAGACAGAAAATTTGAATAAGCCCGCCAGAAAGAGGA
 GCCCAATAAAACAATGCACGTGTTTCAGCAGTGTGTTGGGAAGAGAGGCCCAATCAGAAATTTGGTGGTGAGAAATGTTAAAC TTGGAAC
 AGTGATCCACAGTTCCCAATTC TTGCAGAACTCGCACCCACAGCTGGTGCCTTTTTCTTTGGATCAAGATTAGAGTTGGCCAAAGTGCAGAA
 TTTGCTGGGAATCTTGACGAGCCCCAGAAGGATGTTTA TGAATTGCGCTATAATGGTGCAATTAGATTTGACAGTACACTTTCAGGTTTTGA
 GACCAATAAGAGGTTGGAATGAGAAATTTGAATGCATACCAACAAGAATGGTATGATGAAATGAGTCCAAAACCACAGCGTCAGCGT
 GGTCAGAAGACGGACAAGGAGAAAATGATAATAAAGTTGTCAGCGCCAAAAGCCGTGTGCAGCAAAAATAAGAGTAGAGAGTTGACT
 GCAGAGGACATCAGCCTTCTTAAGAAGATGGATGAGCCCTACTGAAGACACCTCAGAAATAAA

B

>BCV-NP Amino acid sequences
 MSFTPGKQSSSRASSGNRSNGILKWADQSDQSRNVQTRGRRAQPKQTATSQQPSGGNVVPYYSWFSGITQFQKQKGEFEFAEGQGVPIA
 PGVPATEAKGYWYRHNRRSFKTADGNQRQLLPRWYFYLLGTGPHAKDQYGTIDGDFVFWASNQADVNPADILDRDPSSDEAIPTRFPPG
 TVLPQGYIEGSGRSAPNSRSTSRASSRASSAGSRANSRNPSTSGVTPDMADQIASLVLAKLKGDKATKPKQVTKQTAKEIRQKILNKP
 RQKRSPNKQCTVQCCFGKRGPNQFGGGEMLLKLGTSDPQFILAELAPTAGAFFGSRLELAKVQLNSGNLDEPQKDVVYELRYNGAIRFD
 STLSGFETIMKVLNENLNAYQQQDGMNMSPKPQRQRGQKNGQGENDNISVAAPKSRVQQNKSRELTAEISLLKKMDEPYTEDTSEI

C

>BCV primer set
 BCoV NP NF: CAT ATG TCT TTT ACT CCT GGT AAG
 BCoV NP XR: CTC GAG TAT TTC TGA GGT GTC TTC

BCV NP 단백질의 유전자 (A) 및 아미노산 염기서열 (B)과 cloning 프라이머 (C)

- BVDV Erns의 재조합 단백질의 생산을 위해 BVDV Erns를 아미노산 정보 (AAF73256)를 NCBI에서 확보한 후, 재조합 단백질의 생산에 적합하도록 아미노산 코돈 사용빈도 (codon usage)를 최적화하여 유전자 염기서열을 새롭게 디자인하였다. 이들 최적화된 유전정보를 바탕으로 유전자 합성을 통해 BVDV Erns 재조합 단백질 생산을 위한 유전자를 선발한 후 대장균 발현 벡터에 삽입함으로써 BVDV Erns 유전자 cloning을 마쳤다.

A

>BVDV-Erns Nucleotide sequences
 ATGTTCTTGGCAGGGGTTCTCCTTCAGCTGGTACGGGAGAGAACATCACCCAGTGGAACTTAATGGACAATGGCACCGAAGGCATA
 CAGCGGGCGATGTTCC TAAGAGGGGTGAACAGGAGTCTACACGGAATTTGGCCAGAGAAGATTTGCACCGGGATACCAACTCACTT
 AGCAACAGACTATGAGCTCAAGGAGATAGTGGGGATGATGGATGCGAGTGAGAAGACCAACTACACGTGTTGCAGATTGCAAAGGC
 ATGAGTGAACAACAATGTTGGTGTAACTGGTTTTCATATAGAGCCGTGGATATGGCTGATGAACAAAACCCAAAGCAACCTAACTG
 AAGGACAGCCGCTTAGGGAGTGCCTGTGACTTGTAGGTATGACAGGGAACAGAAATGAACATCGTAACACAGGCTAGGGACAGA
 CCCACAACCTGACAGGCTGCAAGAAAGGCAAGAACTTTTCC TTCGACAGGTAATGTTACTAAATGGGCCCTGCAACTTTAAAGTATCA
 GTTGAAGAAAGTCTATAATTAAAGGACATGATTGCGGCAACATGTTACAAGAGACAGCAATACAGCTACTTGTATGGGGCAACCAACCC
 ATCAGGGGAGCAAGGGTGGGGACAGCCAAGCTGACAACCTGGTTAGGGAAGCAATTAAGAACTCTTGGTAGGAAGTTGGAGAAATAA
 AAGTAAATCATGTTTGGAGCATGCACCAAGTCCATACTGTGATGTGGAGAGGAAGATCGGTTACATC

B

>BVDV-Erns Amino acid sequences
 MFLAGVLLQLVTGENITQWNLMDNGTEGIQRAMFLRGNVRSLSLHGIWPEKICTGIPTHLATDYELKEIVGMMMDASEKNTYCCRLQRHEWNK
 HGWCNWFHIEPWIIWLMNKTQSNLQTEGQPLRECAVTCRYDRETELNIVTQARDRPTTLTGCKKGNFSFAGIVLNGPCNFKVSVVEEVLFEK
 DCGNMLQETAIQLLDGATNIEGARVGTAKLTTWLGLKQLRILGRKLENKSKSWFGAHPSPYCDVERKIGYI

BVDV Erns 재조합 단백질의 유전자 및 아미노산 염기서열

- BRV VP6를 암호화하는 유전자의 선발 또한 상기 BVDV Erns 선발과 같은 방법으로 NCBI에서BRV VP 아미노산 정보 (A7J3A1)를 확보한 후, 이들 바탕으로 대장균 발현에 맞도록 아미노산 코돈 사용빈도를 최적화 하였다. 최적화된 유전정보를 바탕으로 유전자 합성을 통해 BRV VP6 유전자를 선발한 후, 대장균 발현 벡터에 삽입함으로써 BRV VP6

재조합 단백질 생산을 위한 유전자 선발을 완료하였다.

A

>BRV-VP6 Nucleotide sequences

```
ATGGATGTCCGTATTCCCTGTCAAAAACCTCTTAAAGATGCAAGAGACAAGATTGTGCGAAGGCACATTATACTCCAATGTAAGTGAT
CTAATACAACAATTTAATCAAATGATAAATACTATGAATGGAAATGAATTCCAAACTGGGGGAATAGGTAATCTACCGATTAGAAAT
TGGAAATTTGATTTTGGATTACTTGAACAACCTACTAAATTTAGATGCTAACTATGTTGAAACGGCTCGCAATACAATTGATTATTT
TGTTGATTTTGTGCGATAATGTATGTATGGACGAAAATGGTAAGAGAATCACAAGAAAATGGAAATGCACCACAATCAGATTCACCTTAG
AAAAATTATCAGGATAAAGTTTAAAAGAATTAATTTTGACAATTCATCAGAATATATTGAGAAC TGGAAATTTGCAAAAATAGGAGGCA
AAGAACGGGTTTTACATTTCAATAACCAAAACATTTTCCCTTATTCAGCATCATTCACGTTGAACAGATCACAACCGGCTCATGACAA
CTTGATGGGTACGATGTGGCTCAATGCAGGATCAGAAATTCAGGTCGCTGGATTGACTATTCATGTGCAATTAACGCACCAGCTAA
TACGCAACAATTTGAGCATAATTGTACAGCTTCGAAGGGTATTGACTACAGCTACAATAACTCTTTTACCCGATGCTGAAAGATTTAGT
TTTCCAAGAGTGATTATTTTCAGCAGATGGAGCGACTACATGGTATTTTAAATCCAGTGATTCTTAGACCAAATAACGTTGAAGTTGAGT
TTCTACTAAACGGGCAGATTAATAACTTACCAAGCAAGATTTGGGACGATCGTCGCAAGAAAATTTGATACAATTAGATTGTCATT
TCAGTTGATGAGACCACCAAATATGACACCAGCGGTTGCAGCATTATTTCCAAATGCACAGCCATTCGAACACCAATGCAACAGTTG
GACTCACGCTTAGAATTGAATCTGCAGTTTGTGAATCAGTGCTTGGCCGACGCTAGAGAAACAAATGCTTGCAAAATGTGACATCTGTGA
GACAAGAATACGCGATACCAGTAGGACAGTTTTTCCCCAGGTATGAATGGACTGATTTGATCACTAACTATTCACCATCAAGGG
AGGATAACTTGCAGCGTGTCTTTACAGTGGCTTCCATTAGAAGCATGCTAGTCAAATGA
```

B

>BRV-VP6 Amino acid sequences

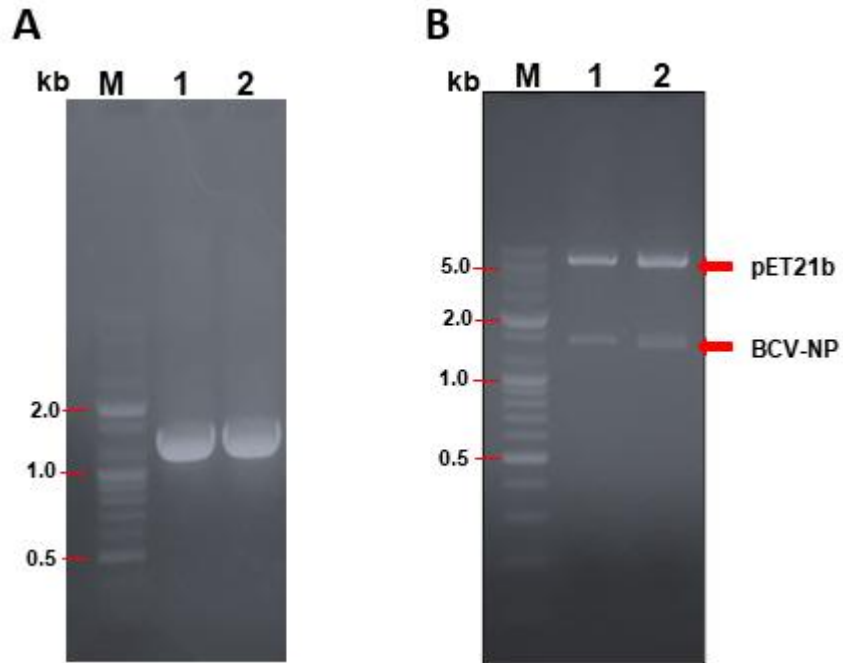
```
MEVLYSLSKTKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRNWTFDFGLLGTLLNLDANYVETARTTIEYFIDFIDN
VCMDEMARESQRNGVAPQSEALRKLKAGIKFKRINFNSSEYIENWNLQNRQRGTGFVHFKPNIFPYSASFLLNRSQPMHDNLMGTMWLN
AGSEIQVAGFDYSCALNAPANIQQFEHIVQLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVINSADGATTWFFNPILRPNNVEVEFLNGQIINTYQARFG
TIIARNFDTIRLSFQLMRPPNMTPAVNALFPQAQPFQHHATVGLTLRIESAVCESVLADANETLLANVTAVRQEYAIIPVGPVFPFGMNVTELI
TNYSPSREDNLQRVFTVASIRSMLIK
```

Bovine Rota virus VP6 단백질의 핵산 및 아미노산 염기서열

○ 소 설사병 병원체 재조합 항원단백질의 생산을 위한 유전자 cloning

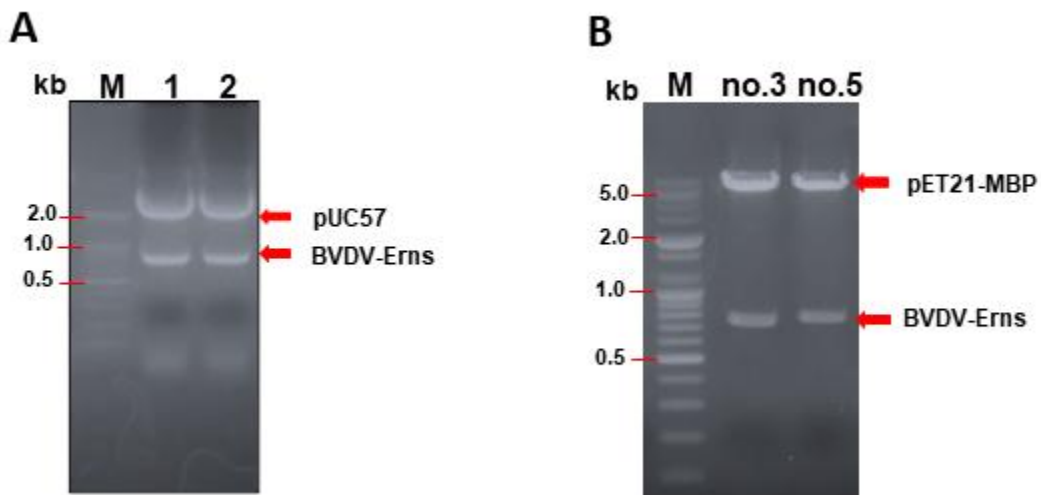
상기에서 선발된 BCV-NP, BVDV-Erns, BRV-VP6 각 유전자들은 제한효소 처리 및 ligation 반응을 통해 대장균의 단백질 생산용 vector 삽입되었다. 모든 재조합단백질은 단백질의 특성 및 정제 등을 고려하여 모든 재조합단백질의 C-말단에는 8X His 분체가 결합되도록 설계하였다.

- 선발된 pBCV-NP는 Hind III와 Xho I 제한효소로 처리된 후, 같은 제한효소인 Hind III와 Xho I으로 처리된 pET21b expression vector에 T4 ligase (NEB co.)를 통해 삽입하였다.



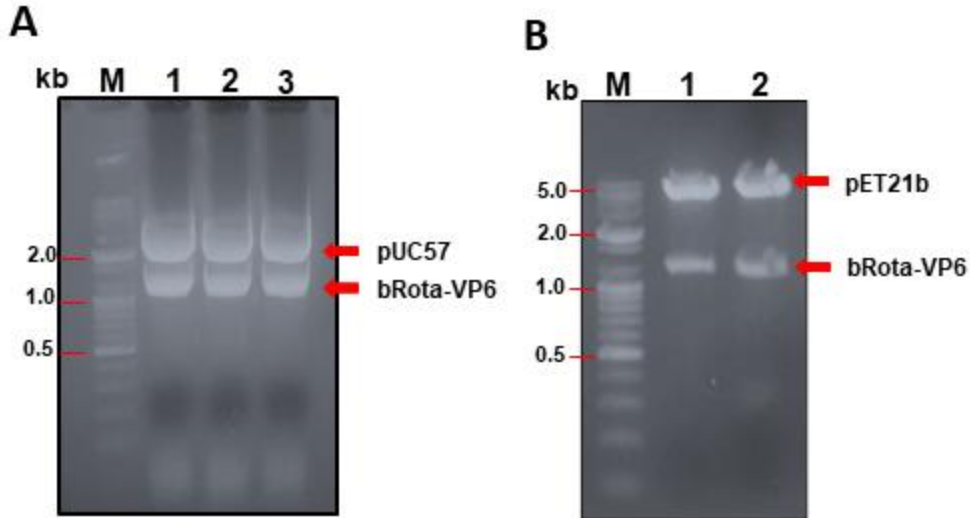
BCV-NP 유전자의 cloning

- 한편, BVDV-Erns는 pBVDV-Erns plasmid DNA에서 Nde I과 Xho I 제한효소를 처리하여 분리한 뒤, 같은 제한효소가 처리된 pMBP vector에 T4 ligase를 통해 삽입되었다. pMBP expression vector는 pET21b vector를 바탕으로 재조합 단백질의 N말단에 MBP (maltose binding protein)이 결합되어 단백질이 안정되게 발현되도록 제작된 vector plasmid로서 효과적으로 BVDV-Erns 단백질의 발현하도록 하였다.



BVDV-Erns 단백질 유전자의 cloning

- 또한, BRV-VP6는 상기 BCV-NP와 동일하게, plasmid DNA pBRV-VP6로부터 Nde I과 Xho I 제한효소 처리로 분리된 후, 같은 제한효소가 처리된 pET21b 발현 vector에 T4 ligase에 의해 삽입시켰다.



BRV-VP6 재조합 단백질 유전자의 cloning

○ 소 설사병 병원체 재조합 항원단백질의 생산 및 정제

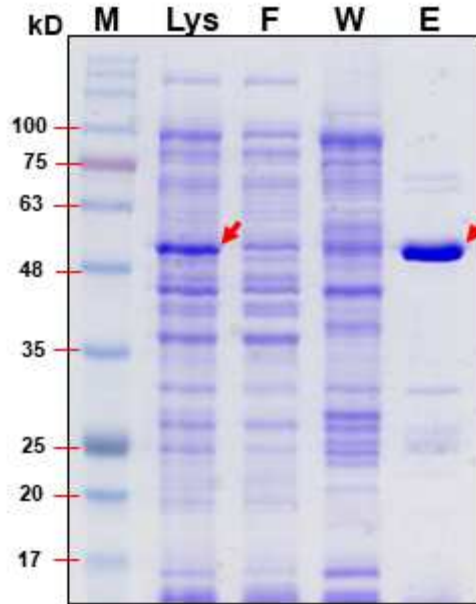
소 설사병 병원체 재조합 유전자가 삽입된 발현 벡터 pET-BCV-NP, pMBP-BVDV-Erns, pET-BRV-VP6 plasmid DNA는 단백질 발현 대장균인 BL21에 열충격 방법에 따라 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 대장균은 항생물질이 100 ug/ml로 처리된 LB 고체배지에 도말하여 상기 plasmid가 형질전환된 단일 콜로니를 선발하였다.

소 설사병 병원체 유전체가 형질전환된 대장균 균주의 단일콜로니를 적절한 항생물질이 처리된 LB 액체배지에 접종하였다. 이들 배양액을 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 뒤 0.5 mM IPTG를 처리하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였으며, SDS-PAGE 분석을 통해 단백질 발현상을 분석하였다. 각각의 재조합 단백질에 맞게 접종조건, IPTG 농도, 배양시간, 배양온도 등을 달리하여 최적화하였으며, 최고의 재조합 단백질 발현조건을 확립하였다. 최적의 조건에서 발현된 BCV-NP, BVDV-Erns, BRV-VP6 등 각 재조합 단백질들은 NiKel을 이용한 친화성 크로마토그래픽을 통해 최종 정제되어 항원단백질로 제공되었다.

각 재조합 단백질의 정제를 위해 최적의 조건에서 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도한 후 원심분리를 통해 대장균들을 회수하였다. 이들 대장균 침전물을 1XPBS (pH 7.4)에 재현탁시킨 후, 초음파파쇄기를 이용하여 대장균 세포를 파쇄하여 재조합단백질들을 용출시켰으며 원심분리를 통해 재조합단백질이 용출된 용액만 회수하였다. 이들 용액을 1XPBS (pH 7.4) 용액으로 미리 균등화 시킨 Nikel ion resin column에 주입하여 재조합 단백질이 Nikel에 결합하도록 하였다. 동일한 1XPBS (pH 7.4) 용액으로 1회, 30mM Imidazole이 첨가된 1XPBS (pH 7.4) 용액을 이용하여 3회 수세한 후 250mM Imidazole이 첨가된 1XPBS (pH 7.4) 용액을 이용하여 재조합 단백질을 용출하였다. 용출된 용액은 SDS-PAGE 분석을 통해 재조합단백질의 존재를 확인 및 분석한 후, 1XPBS (pH 7.4) 용액으로 투석하여 용액내 Imidazole를 제거하였다. 최종 정제된 각 재조합단백질들은 Vivaspin Tubo 15 (Sartorius Co.)를 이용하여 농축하여 정량한 후 항체단백질 생산을 위한 항원으로 제공되었다.

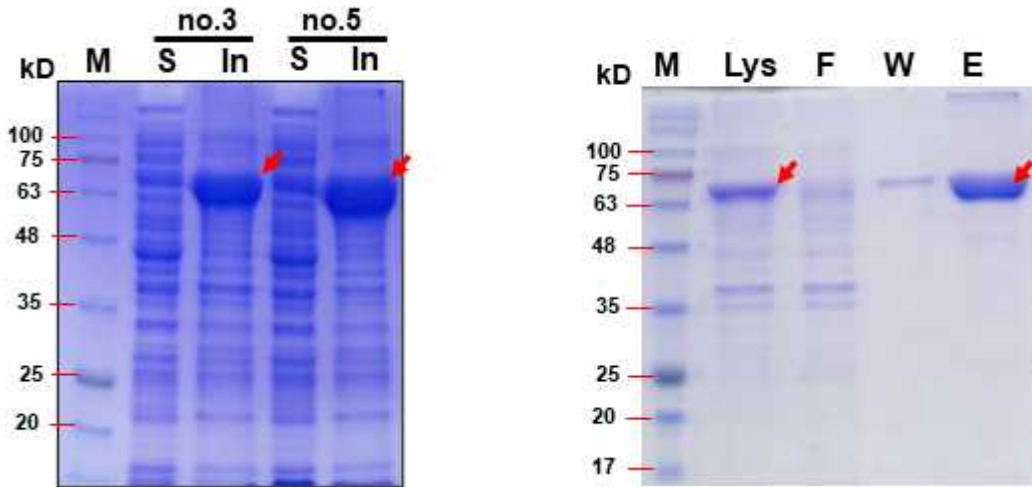
- BCV-NP 재조합단백질은 459 아미노산으로 되어 있으며, 약 51kDa의 재조합 단백질을 생

성한다. 하기 그림에 나타난 바와 같이 BCV-NP를 발현하는 대장균 세포의 용출액에서 50kDa의 단백질이 과발현 되고 있음을 확인할 수 있으며, Nickel resin column을 통한 친화성 크로마토그래프를 통해 BCV-NP 재조합 단백질이 잘 정제되었음을 볼 수 있다.



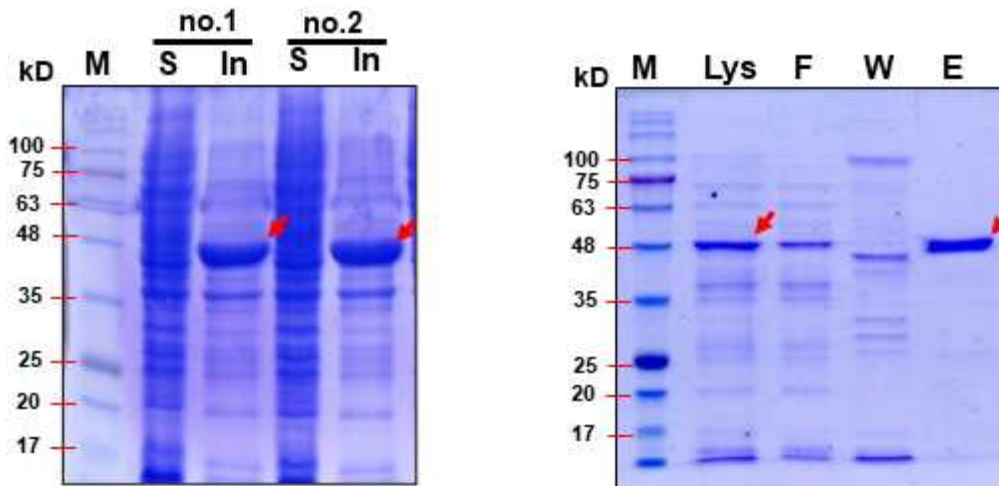
BCV-NP 재조합 단백질의 생산 및 정제

- 한편, 255 아미노산으로 구성된 25kDa의 BVDV-Erns 재조합 단백질은 재조합단백질의 용해성 및 정제를 증가를 위해 N-말단 부근에 40kDa 크기의 MBP (maltose binding protein) 그리고 C-말단에는 8XHis 분체를 결합시켜 약 71kDa 재조합 단백질을 생산하도록 제작하였다. 아래 그림에 나타난 바와 같이 MBP가 결합된 BVDV-Erns 재조합 단백질은 70kDa 부근에서 inclusion body 형태로 높게 발현됨을 알 수 있다. 이들 단백질은 8M urea (pH8.0) 용액을 이용하여 용출시킨 후, 같은 8M urea (pH 8.0) 용액으로 균등화 시킨 Nickel resin column을 통해 정제하였다. 이들 정제된 재조합 단백질은 6M urea (pH 8.0), 4M urea (pH 8.0), 2M urea (pH 8.0), 1M urea (pH 8.0) 용액을 이용하여 차례로 투석하여 단백질 재조립 (refolding) 시킨 후, 위의 BCV-NP 재조합단백질의 방법과 동일하게 재조합 단백질을 농축시킨 후 정량하여 항원단백질로 사용하였다. 아래 그림과 같이 MBP가 결합된 BVDV-Erns 재조합 단백질은 약 70kDa의 크기로 잘 정제되어 항체단백질 제작에 제공되었다.



BVDV-Erns 재조합 단백질의 발현 및 정제

- 또한, 398 아미노산으로 구성된 약 48kDa BRV-VP 재조합 단백질을 발현하는 대장균을 최적에 조건에서 배양 후 재조합단백질을 분리하였을 때, 이들 단백질 또한 약 48 kDa의 부근에서 Inclusion body의 형태로 높게 발현하는 것으로 나타났다. 이들 단백질 또한, 상기의 BVDV-Erns와 같은 방법으로 8M urea (pH 8.0)로 재조합 단백질을 용출시킨 후, Nickel resin column을 이용한 친화성 크로마토그래픽 정제 및 단백질 제조과정과정을 거쳐 분리정제 하였다. 그림과 같이, BRV-VP6 재조합 단백질은 약 48kDa의 단편으로 정확하게 분리 정제되었으며 항체단백질의 제작을 위한 항원으로 제공되었다.



BRV-VP6 재조합 단백질의 생산 및 분리 정제

○ 소 설사병 병원체 단일클론 항체단백질의 생산

소설사병 병원체의 진단을 위한 단일클론 항체 생산을 위해 상기에서 발현 정제한 재조합 단백질인 BCV-NP, BVDV-Erns, BRV-VP6 등을 항원 단백질로 이용하였다. 한편, 원생병원체 *Giardia*의 항체 생산을 위한 항원단백질은 *Giardia* cysts를 Bio point사로부터 구매하여 사용하였다.

항체 생성을 위해 상기 항원단백질들을 1 mg/ml 농도로 희석한 후, Freund's complete

adjuvant (FCA, Sigma 사)와 혼합하여 에멀전을 제조하였으며, BALB/c 마우스의 foot pad에 주입함으로써 면역화를 유도하였다. 항원단백질과 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Sigma 사)를 혼합한 에멀전을 2주 간격으로 3회 추가 면역시킴으로써 면역화의 상승을 유도하였다.

한편, 단일클론 항체 생성을 위해 면역화가 최종 완료된 후, 면역화된 마우스로부터 슬라브와 슬와부의 림프절을 적출하여 림프절 세포를 회수하였다. 회수된 림프절 세포와 단일클론 항체개발에 널리 사용되고 있는 SP2/0 골수종 세포주를 PEG 1500(Invitrogen 사)과 함께 혼합하여 세포융합을 유도하였다. 이들 융합된 세포액을 HAT(hypoxanthine, aminopterin, thymidine)가 함유된 배지에 부유시킨 뒤 96 well plate (SPL 사)에 분주 한 후 CO2 배양기에서 세포배양하였다.

융합된 세포주로부터 단일클론 항체 생성 세포주를 선별하기 위해 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용한 융합 세포의 선별을 실시하였다. 각각의 재조합 항원 단백질을 1 µg/ml 농도가 되도록 50mM sodium bicarbonate buffer (pH9.6)에 희석하여 96 well immune-plate (SPL사)에 50 µl씩 분주한 후, 4°C에서 16시간 반응시켰다. 각 plate를 PBS-T (1XPBS-0.05% Tween-20) 용액으로 3회 세척한 후, 각 well에 융합 세포주 배양액 100 µl를 첨가하고 37°C에서 1시간동안 더 반응시킨다. 상기와 동일한 PBS-T 용액으로 3회 세척하고 HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 anti-mouse IgG 항체 (Fitzerald 사) 희석액을 50 µl씩 각 well에 첨가한다. 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 상기와 동일하게 3회 세척하고 HRP 기질 용액인 TMB solution을 첨가한다. TMB용액 첨가 후 상온에서 5~10분 반응시킨 다음 0.5 M H₂SO₄ 용액을 첨가하여 반응을 완료시킨다. ELISA 반응 결과는 ELISA reader를 통해 250nm파장에서의 흡광도를 측정함으로써 분석하였다. 단일클론 항체를 생성하는 세포주는 ELISA분석에서 상대적으로 아주 강한 흡광도 수치를 나타낸다. 이들 ELISA 분석을 통한 단일클론 항체를 생성하는 1차 세포주를 선별하고, 각 항원농도 별 2차 ELISA분석을 실시하였으며, 최종적으로 각 병원체에 대한 단일클론 항체 생성 세포주들을 선별하였다.

Procedure Details
 Plate Type 96 WELL PLATE
 Eject plate on completion
 Read Absorbance Endpoint
 Full Plate
 Wavelengths: 450
 Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 8

Results
 Actual Temperature: 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.163	0.16	0.143	0.107	0.146	0.133	0.157	0.141	0.151	0.153	0.158	0.181
B	0.134	0.116	0.11	0.1	0.122	0.099	0.109	0.102	0.127	0.108	0.109	0.135
C	0.171	0.106	0.089	0.107	0.091	0.119	0.12	0.094	0.1	0.113	0.117	0.136
D	0.142	0.115	0.117	0.095	0.094	0.097	0.093	0.105	0.101	0.12	0.091	0.136
E	0.128	0.117	0.095	0.114	0.096	0.086	0.097	0.086	0.109	0.119	0.1	0.134
F	0.127	0.124	0.108	0.114	0.094	0.11	0.091	0.116	0.122	0.118	0.11	0.159
G	0.139	0.116	0.114	0.114	0.107	0.115	0.088	0.097	0.1	0.112	0.107	0.147
H	0.205	0.131	0.141	0.126	0.136	0.133	0.122	0.134	0.141	0.155	0.14	0.152

Results
 Actual Temperature: 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.168	0.136	0.133	0.122	0.138	0.142	0.119	0.15	0.146	0.126	0.157	0.18
B	0.147	0.099	0.102	0.097	0.105	0.089	0.101	0.107	0.101	0.099	0.094	0.136
C	0.138	0.122	0.106	0.088	0.093	0.104	0.105	0.114	0.118	0.106	0.112	0.146
D	0.125	0.093	0.097	0.081	0.088	0.096	0.109	0.099	0.085	0.101	0.137	0.111
E	0.139	0.117	0.09	0.118	0.104	0.098	0.085	0.104	0.109	0.088	0.131	0.189
F	0.136	0.105	0.096	0.094	0.108	0.096	0.086	0.097	0.1	0.105	0.129	0.113
G	0.117	0.112	0.112	0.091	0.101	0.104	0.117	0.103	0.104	0.112	0.094	0.179
H	0.177	0.152	0.118	0.149	0.148	0.124	0.145	0.144	0.114	0.149	0.162	0.214

Results
 Actual Temperature: 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.148	0.125	0.157	0.132	0.139	0.118	0.129	0.128	0.13	0.125	0.119	0.144
B	0.134	0.12	0.103	0.112	0.107	0.114	0.113	0.107	0.108	0.113	0.119	0.144
C	0.135	0.135	0.111	0.112	0.107	0.106	0.113	0.12	0.11	0.113	0.134	0.141
D	0.146	0.103	0.102	0.119	0.112	0.089	0.153	0.1	0.091	0.101	0.12	0.15
E	0.108	0.108	0.096	0.114	0.112	0.094	0.125	0.107	0.125	0.101	0.12	0.135
F	0.103	0.091	0.116	0.114	0.093	0.088	0.086	0.092	0.103	0.109	0.112	0.132
G	0.126	0.116	0.126	0.125	0.106	0.119	0.104	0.107	0.127	0.118	0.116	0.156
H	0.153	0.125	0.128	0.172	0.13	0.118	0.147	0.15	0.14	0.162	0.172	0.169

Results
 Actual Temperature: 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.185	0.145	0.185	0.212	0.188	0.172	0.171	0.173	0.176	0.149	0.183	0.22
B	0.185	0.17	0.169	0.133	0.171	0.133	0.124	0.184	0.164	0.166	0.159	0.218
C	0.142	0.169	0.16	0.159	0.144	0.177	0.141	0.148	0.15	0.138	0.114	0.171
D	0.162	0.15	0.148	0.134	0.15	0.13	0.132	0.115	0.159	0.138	0.148	0.191
E	0.195	0.156	0.13	0.13	0.174	0.178	0.141	0.176	0.121	0.129	0.115	0.22
F	0.169	0.132	0.144	0.119	0.153	0.13	0.178	0.169	0.163	0.185	0.177	0.176
G	0.147	0.124	0.118	0.13	0.146	0.122	0.163	0.115	0.137	0.154	0.143	0.159
H	0.18	0.153	0.152	0.155	0.189	0.184	0.146	0.17	0.203	0.167	0.167	0.228

ELISA 분석을 통한 *Giardia* 단클론 항체 생성 세포주의 1차 선별 (예시)

Procedure Details
 Plate Type 96 WELL PLATE
 Eject plate on completion
 Read Absorbance Endpoint
 Full Plate
 Wavelengths: 450
 Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 8

Results
 Actual Temperature: 0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.756	0.659	0.559	0.092	0.093	0.089	0.096	0.094	0.105	0.089	0.088	0.096
B	0.745	0.734	0.645	0.358	0.086	0.096	0.088	0.085	0.178	0.082	0.082	0.083
C	0.823	0.82	0.716	0.522	0.089	0.095	0.086	0.083	0.212	0.083	0.083	0.086
D	0.838	0.773	0.855	0.748	0.09	0.097	0.086	0.09	0.223	0.084	0.086	0.089
E	0.792	0.776	0.75	0.751	0.087	0.092	0.082	0.088	0.228	0.087	0.089	0.09
F	0.795	0.782	0.808	0.517	0.392	0.1	0.087	0.094	0.228	0.095	0.098	0.099
G	0.835	0.83	0.84	0.772	0.108	0.11	0.106	0.104	0.251	0.113	0.105	0.129
H	0.862	0.898	0.819	0.905	0.121	0.124	0.116	0.121	0.271	0.112	0.107	0.12

ELISA 분석을 통한 *Giardia* 단클론 항체 생성주의 2차 선별 (예시)

아래의 표에 보여준 바와 같이, BCV-NP에 대한 단일항체 세포주로 38세포주가 최종 선
 발되었고, BVDV-Erns에 대해서는 43세포주, BRV-VP6에 대해서는 35세포주 그리고 *Giardia*

에 대해서는 31세포주를 최종 선발할 수 있었다.

ELISA 분석을 통해 선발된 소 설사병 병원체의 단일클론
항체 생성 세포주의 목록

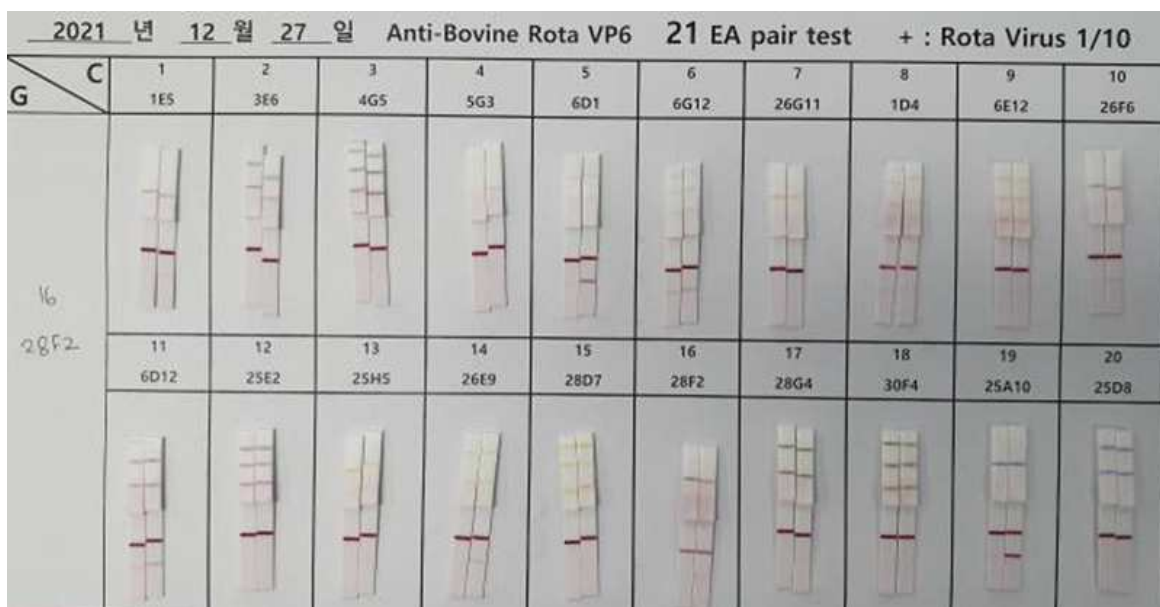
No.	BCV mAb	BVDV mAb	BRV mAb	Giardia mAb
1	13B6	2H10	11F12	A2G4
2	1A6	6C3	11G1	A4A9
3	1C3	8G5	12F4	A4H3
4	1E8	2E11	12F5	B1B11
5	1H5	7A11	16A3	B3B1
6	2G2	3B1	1B7	B3G1
7	2G4	4A10	1D4	B4E1
8	3A3	4G3	1E5	B4E12
9	3B6	6A9	25A10	C1C9
10	3E4	4G7	25D8	C1H5
11	3E9	2H2	25E2	C2B7
12	3G11	3F1	25H5	C3A1
13	3G9	4E7	26E9	C3G1
14	4B1	4E7-1	26F6	C4E8
15	4C5	4E8	26G11	D1E8
16	4F7	5B1	27E12	E1B10
17	4G7	7B3	28D7	E2F4
18	4H10	8A3	28F2	E2H12
19	5A10	2H2	28G4	E2H7
20	5D1	2H6	28H3	E2H9
21	6F6	3F1	30D7	E3H3
22	7A6	4E2	30F4	E3H3-1
23	7E8	5B1	3E6	E4E2
24	7G11	6G1	4G5	E4G4
25	8C8	A6B2	5G3	F1E8
26	8C9	4E8	6D1	F4C11
27	A1B9	10F6	6D12	F4E1
28	A1D11	B1G3	6E12	F4E12
29	A1E9	4E7	6G12	E2G7
30	A1H5	4E7-1	6H9	1F11
31	A2D10	A1F12	7E1	2C10
32	A3B11	14H3	8B4	1G1
33	A3H7	4E8(SFM)	8G3	4G5
34	A4D3	4E8	13G9	
35	A4E11	1E6	M1	
36	A4F9	11G1		
37	A4H11	8C2		
38	A7E6	7F12		
39		7D6		
40		8G11		
41		22D4		
42		24A4		
43		16D6		

상기에서 선별한 각 병원체 단일클론 항체 생산 세포주들은 T-25, T-75, T-175 flask에 순차적으로 배양함으로써 배양세포주를 증식시킨 후, 항체 생산 세포주와 배양액을 분리하여 회수한다. 회수된 배양액은 ammonium sulfate 침전을 통해 단백질을 농축한 후, Protein A/G가 접합된 cellulose bead를 통한 친화성크로마토그래피를 통해 항체단백질을 정제하고 용출버퍼 (Glycine buffer, pH 3.0)로 용출하였다. 용출된 각 항체단백질은 중화버퍼 (Tris-HCL, pH 9.0)를 첨가하여 중화시킨 후, 1XPBS buffer로 투석한 후 정량하여 저장하였다. 한편, 회수한

세포주들은 액체질소에 동결보존하고, 일부는 다시 마우스의 복강에 주입하여 단일클론 항체 생성 복수(ascite)를 만들고, 상기의 항체정제 방법과 동일한 정차에 따라 이들 복수로부터 각각의 단일클론 항체를 정제하였다.

○ 소 설사병 병원체 진단을 위한 항체 쌍의 선별

소 설사병 병원체 다중진단 키트의 제작을 위한 최적의 항체쌍 선별을 실시하였다. 각 병원체들에 대한 생산 정제된 단일클로항체 단백질들을 이용하여 각 병원체 항원단백질에 대한 최적의 항체쌍 선별을 lateral flow immunoassay 액상테스트를 기반으로 한 half-test를 통해 1차 항체쌍을 선별하였다. 먼저 Nitrocellulose membrane (Nupore 사, 10 µm)의 control line에는 goat anti-mouse IgG를 분주하고, test line에는 각각의 항체를 분주한 후 하룻밤 동안 건조시킨다. 건조된 Nitrocellulose membrane에 흡착패드를 부착하고 4 mm 사이즈로 절단하여 pair test를 위한 스트립을 제작하였다. 96 well plate에 금 나노입자와 결합시킨 각 항체 5 µl를 주입 후, 100 ng/ml의 농도로 희석한 각 재조합 항원단백질을 주입하고 상기 pair test를 위한 스트립을 각 test well에 넣어 반응시킨다. 반응 10분 뒤, nitrocellulose membrane상의 C선 및 T선의 검출신호 강도를 비교하고 T선 생성 강도가 높은 항체쌍을 1차 선별하였다. 이를 1차 항체쌍 선별을 통해, 하기 도7-B에 제시한 바와 같이, BCV-NP에 있어서는 A4H11을 포함 10개의 항체쌍이 선별되었으며, BVDV-Erns의 경우 14H3을 포함 10개의 항체쌍, BRV-VP6는 M1을 포함 11개 그리고 *Giardia*는 4G5를 포함 6개의 항체쌍이 1차 선별되었다.



Half-test를 통한 BRV-VP6 항체 쌍 선별 (예시)

건조상태로 제조된 중합체 패드의 경우, 액상 기반 half-test보다 신호세기가 감소하거나 다른 비특이 문제가 대두될 수 있다. 따라서, 각 병원체에 대한 최적의 항체쌍을 찾기 위해 1차 선별을 통해 선별된 각 병원체 항체쌍을 중심으로 Full strip을 이용한 2차 항체쌍 선별을 실시하였다. 먼저 상기 half-test 방법과 같이 Nitrocellulose membrane에 goat anti-mouse IgG와 선별된 항체쌍 항체를 C선과 T선에 각각 분주한 후, 건조시킨다. 금나노입자가 결합된

또 다른 항체쌍 항체를 금나노입자 중합체 pad에 분주한 후, 건조시킨다. 건조된 Nitrocellulose membrane에 중합체 pad를 부착시키고, 흡수 pad와 시료 공급 pad를 부착한 후, 0.6mm로 절단하여 full strip를 제작하였다. 각 항원단백질을 고농도와 저농도로 준비된 assay buffer (1XPBS, 0.1% triton X100)에 희석하고 각 Strip에 분주한 후, 10분동안 반응시키고 그 결과를 음성대조구인 assay buffer 결과와 비교 분석하였다. 2차 항체쌍 선별을 통해 반응성이 강하고 비특이적 반응성이 없는 최적의 항체쌍을 선별하였으며, 하기 도해7-C에 제시한 바와 같이 A7E6와 A4H11이 BCV진단을 위한 최적의 항체쌍으로 선발되었으며, 4E8과 14H3이 BVDV 진단을 위한 항체쌍으로, 4G5와 13G9가 BRV 진단을 위한 항체쌍으로 그리고 1F11과 2C10이 소 설사병 *Giardia* 진단을 위한 최적의 항체쌍으로 선발되었다.

소설사병 유발 병원체 진단을 위한 항체쌍 선별 목록.

- A. half-test를 통한 1차 선발된 항체쌍 목록,
- B. 병원체별 최종 선발된 최적의 항체쌍 목록

A

No.	BCV mAb	BVDV mAb	BRV mAb	Giardia mAb
1	4G7	4E7	6D1	1F11
2	2G2	4E7-1	25A10	E2G7
3	A3H7	A1F12	28F2	1G1
4	3A3	6C3	13G9	2C10
5	3B6	1E6	1D4	A2G4
6	2G2	4E8	6D12	4G5
7	7A6	4E8	25H5	
8	4G7	A6B2	26F6	
9	A7E6	4B5-3	28O7	
10	A4H11	14H3	28G4	
11			M1	

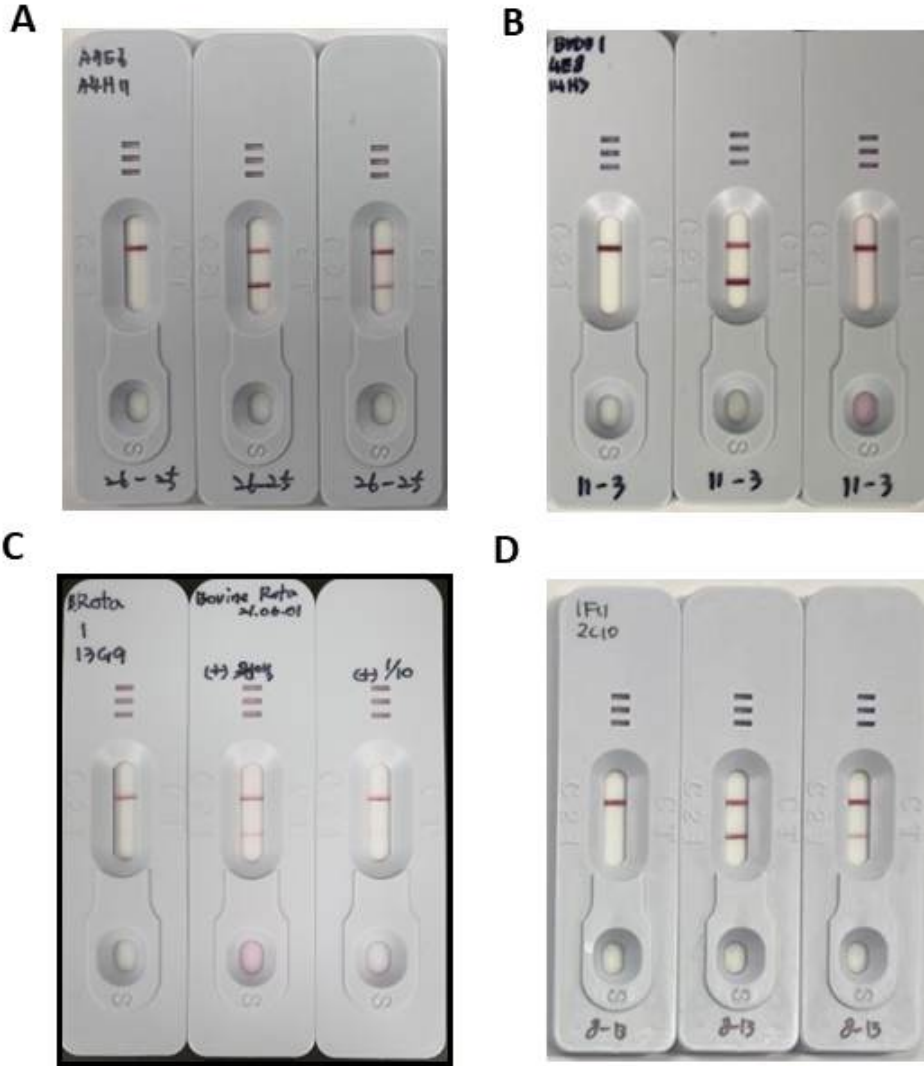
B

Pair	BCV mAb	BVDV mAb	BRV mAb	Giardia mAb
Capture	A7E6	4E8	M1	1F11
Detector	A4H11	14H3	13G9	2C10

○ 소 설사병 유발 병원체 진단 키트의 민감도와 특이도 검사

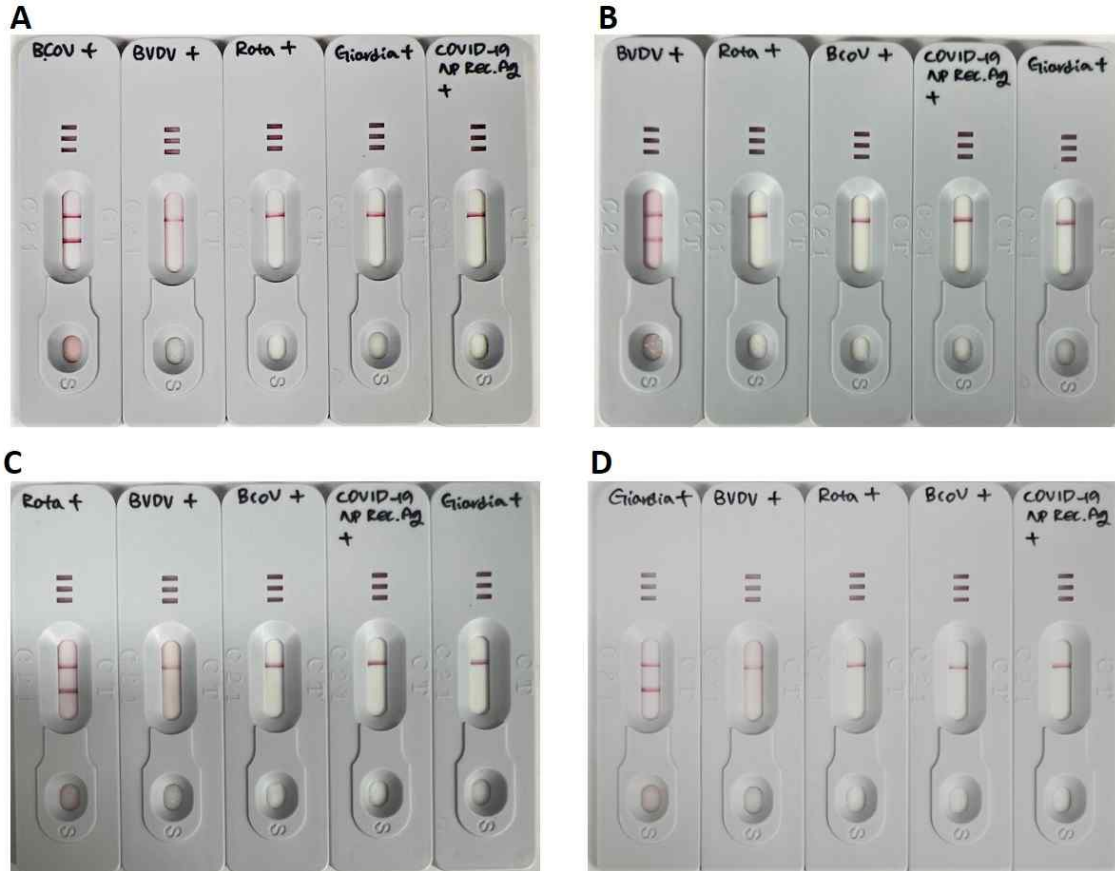
소 설사병 병원체 진단의 민감도와 특이도 검사를 위해 상기에서 선발된 최적의 항체쌍을 이용하여 각 병원체 별 Lateral flow assay kit를 제작하고 각 재조합 항원단백질 및 타 단백질을 이용한 비특이 반응 및 교차 반응성을 분석하였다. BCV 진단을 위해 capture mAb로 상기의 A7E6를, 금나노중합 mAb로 A4H11로 하여 상기와 같이 LFA 키트를 제작하였다. BVDV의 경우 4E8을 Capture 항체로, 14H3을 금나노 중합 항체로 하였으며, BRV의 진단키트에는 4G5를 capture 항체로 13G6을 금나노 중합항체로 하였고, 소 설사병 *Giardia* 진단을 위해서는 1F11을 capture 항체로 2C10을 금나노중합항체로 하여 진단키트를 제작하였다. 제작된 각 진단키트를 이용하여 각각의 항원단백질에 대한 민감도를 분석하였다.

- BCV-NP 단백질을 100ng/ml, 10ng/ml로 희석하여 분석한 결과, 아래 그림과 같이 10ng/ml의 항원도 검출할 수 있는 높은 반응성을 보여주었다.
- 한편, BVDV 검정에 있어서는 BVDV 바이러스가 감염된 세포추출물을 희석하여 10배 및 1000배 희석액을 비교 분석한 결과, 1000배 희석액에서는 검출되지 않았으나 100배 희석액에서는 강하게 검출되어 높은 반응성을 보여주었다.
- 또한, BRV 검정을 위해 BRV 감염 세포추출액을 100배 희석해서 사용한 결과, 100배 희석한 용액에서는 명확하지 않았지만 원액에서는 잘 검출됨을 알 수 있었다.
- *Giardia* 항원단백질을 100ng/ml, 10ng/ml로 희석하여 제작된 *Giardia* 진단키트를 검정한 결과 하기 그림과 같이 10ng/ml의 항원단백질도 잘 검출할 수 있음을 보여주었다.



소설사병 유발 병원체 진단 키트의 민감성 검정. A. BCV 진단키트 검정. B, BVDV 진단키트 검정. C, BRV 진단키트 검정. D, *Giardia* 진단 키트 검정

- 한편, 상기 항원단백질 및 Covid-19 NP 재조합 단백질을 이용한 타 항원단백질을 이용한 비특이적 교차반응성 분석에서는 아래 그림과 어떤 교차반응상 비특이적 반응도 나타나지 않았다. 이들 결과를 종합할 때, 이들 항체단백질을 이용한 진단키트를 이용하면 편리하게 소설사병 병원체를 진단할 수 있을 것으로 보인다.



송아지 설사증 유발 병원체 진단키트의 교차반응 비 특이성 검정. A, BCoV 진단키트 교차반응 검정. B, BVDV 진단키트 교차반응 검정. C, BRV 진단키트 교차반응 검정. A, *Giardia* 진단키트 교차반응 검정.

(3) 설사증 유발 병원체 다중 진단키트의 개발 및 유효성 검정

○ 소 설사병 유발 병원체 진단 키트의 비교검정

본 연구과제 수행으로 개발된 소 설사병 병원체 진단키트와 시판중인 진단 키트 및 RT-PCR, real-time PCR 등을 통한 진단과의 진단 효능을 비교 분석하였다. 이를 위해 국내 대형 축산농가 및 각 도 지역의 동물위생시험소를 중심으로 수집한 분변, 혈청 및 혈액 샘플 등 가검물 검체 분석을 통해 위양성 및 위음성으로 확인된 검체를 중심으로 개발된 진단키트의 효능을 비교분석하였다.

- 먼저, Bovine corona virus 진단에 있어, RT-PCR 분석에서 양성검체로 들어난 49 검체 (91%) 와 음성으로 밝혀진 5개의 음성검체 (9%) 등 총 54 검체를 중심으로 분석하였다. 그 결과, real-time PCR 진단에서는 57%가 양성, 43%가음성으로 나왔으며, 새로 개발된 항원진단 키트에서는 96%가 양성, 4%가 음성반응을 보였다. 또한, 이들 진단 방법 상호간 일치도를 분석한 결과, 새로 개발한 보레다 항원진단 키트와 RT-PCR법은 96%의 일치성을 나타낸 반면, real-time분석과는 각각 57%와 59%의 낮은 일치도를 보여주었다.

제품	제품	양성	음성	종합
제품별 진단율	RT-PCR법	49/54 (91%)	5/54 (9%)	-
	real-time PCR	29/51 (57%)	22/51 (43%)	-
	보레다	52/54 (96%)	2/54 (4%)	-
일치도	real-time PCR/RT-PCR법	27/46 (59%)	3/5 (60%)	30/51 (59%)
	보레다/RT-PCR	48/49 (98%)	1/5 (20%)	49/54 (91%)
	보레다/real-time PCR	28/29 (97%)	1/22 (5%)	29/51 (57%)

- Bovine viral diarrhea virus 진단에는, RT-PCR 분석에서 57%가 양성, 34% 음성반응을 보인 94 검체를 이용하여 real-time PCR과 신규 개발된 항원진단 키트를 비교분석하였다. 그 결과, RT-PCR과 달리 real-time PCR 법에 의한 진단에서는 41% 양성, 59% 음성으로 나왔으며, 새로 개발된 키트를 통해서는 34% 양성, 66%가 음성으로 나왔다. 또한, 이들 진단법의 일치도를 분석한 결과에서도, 신규 개발된 항원진단 키트와 real-time PCR 진단은 RT-PCR법에 대해 각각 32%, 41%의 낮은 일치도를 보였으며, 보레다 항원진단 키트와 real-time PCR 법의 일치도 또한 60% 내외로 나타나 진단 방법에 따라 변이가 큰 것으로 나타났다.

제품	제품	양성	음성	종합
제품별 진단율	RT-PCR법	54/94 (57%)	40/94 (43%)	-
	real-time PCR	39/94 (41%)	55/94(59%)	-
	보레다	32/94 (34%)	62/94(66%)	-
일치도	real-time PCR/RT-PCR법	19/54 (35%)	20/40 (50%)	39/94 (41%)
	보레다/RT-PCR	17/54 (32%)	15/40 (38%)	30/94 (32%)
	보레다/real-time PCR	16/39 (41%)	38/55 (69%)	55/94 (59%)

- Bovine Rotavirus 진단에서는 RT-PCR 분석에서 양성으로 드러난 70개의 양성검체 (88%)와 음성반응을 보인 10개의 음성검체 (12%)등 80 검체를 대상으로 비교분석 하였다. 그 결과, 항원진단 키트에서는 99%가 양성검체로 1%가 음성검체로 나타났으며, real-time PCR에서는 68% 가 양성, 32 %가 음성으로 나타났다. 이들의 진단 일치도를 분석한 결과, 항원진단키트는 RT-PCR과 86%의 높은 일치도를 나타낸 반면 real-time PCR은 72% 정도의 다소 낮은 일치도를 보였다.

제품	제품	양성	음성	종합
제품별 진단율	RT-PCR법	70/80 (88%)	10/80 (12%)	-
	real-time PCR	51/75 (68%)	24/75 (32%)	-
	보레다	79/80 (99%)	1/80 (1%)	-
일치도	real-time PCR/RT-PCR법	51/65 (78%)	1/10 (10%)	52/75 (72%)
	보레다/RT-PCR	69/70 (99%)	0/10 (0%)	69/80 (86%)
	보레다/real-time PCR	51/51 (100%)	1/24 (4%)	52/75 (72%)

- 또 다른 설사증 유발 병원 원충인 *Giardia* 진단에서는 PCR 방법에 의한 진단에서 양성반응을 보인 8 검체 (36%)와 음성결과로 나타난 14 검체 (64%)를 대상으로 기존 시판중인 A사의 제품과 새로 개발된 항원진단키트를 비교분석하였다. 그 결과, PCR 진단가 반대로 A사 제품은 64%가 양성 36% 음성으로 판명되었으며, 신규 개발된 항원진단 키트 또한 59%가 양성으로 41%가 음성으로 분석되었다. 진단 방법에 따른 진단 일치도를 분석한 결과, A사 제품과 PCR 법의 일치도는 0으로 나타나 전혀 반대의 결과로 나타났다. 한편, 새로 개발한 항원진단 키트는 PCR법과 비교했을 때 일치도는 41%로 나타난 반면, A사 제품과는 59%의 일치도를 보였다.

제품	제품	양성	음성	종합
제품별 진단율	PCR법	8/22 (36%)	14/22 (64%)	-
	A사	14/22 (64%)	8/22 (36%)	-
	보레다	13/22 (59%)	9/22 (41%)	-
일치도	A사/PCR법	0%	0%	0%
	보레다/PCR	8/4 (50%)	5/14 (36%)	9/22 (41%)
	보레다/A사	9/14 (64%)	4/8 (50%)	13/22 (59%)

- 위의 결과에 따르면, 병원체에 따라 위양성과 위음성 진단 결과가 매우 상이 하였다. 특히, BVDV의 진단에 있어서는 RT-PCR, real-time PCR, 신규 항원진단 키트 모두 60% 이하의 일치도를 보여 병원체 진단에 있어 좀더 보완이 필요할 것으로 보인다. 한편, BCV와 BRV의 진단에 있어서는 3가지 진단 모두 높은 일치도를 보이나 특히 real-time PCR보다는 신규 항원진단 키트가 RT-PCR과 86% 이상의 더 높은 일치도를 나타냈다. 한편, *Giardia* 검체 비교에서는 진단법에 대한 정확한 결론을 내리기에는 양성 검체의 수가 너무 적었다. 하지만, 기존 시판중인 A사의 제품에 비해서, 새로 개발된 항원진단 키트가 PCR

진단과 더 높은 진단 일치도를 나타냈다.

○ 소 설사병 병원체 다중 진단 키트의 제작

소 설사병 병원체 다중 진단 키트 제작에 앞서, 상기에서 선정된 각 항체쌍들에 대한 최적의 금나노입자 중합체 형성 조건을 확립하였다. 먼저 40nm 금나노입자와 10mM PB를 사용하여 항체와 금나노입자 중합체의 색 변화 및 응집 현상의 형성을 분석함으로써 각 항체 별 최적 중합체 조건을 설정하였다.

또한, 분변 등 검체에서 소설사병 병원체를 효과적으로 진단할 수 있는 최적의 분석 용액 조건을 설정하기 위해 분석 용액의 salt 농도, pH조건, 계면활성제 조건 등 변화를 분석하였다. 그 결과, 중성 pH조건, 낮은 농도의 계면활성제가 포함된 인산염 용액 (1XPBS, 0.1% Trinton-X100, pH7.4)이 최적의 분석용액으로 선정되었다.

한편, 소 설사병 병원체 BCV, BVDV, BRV, *Giardia*을 한번에 진단할 수 있는 진단 스트립 제작을 위해 하기 도해10에 제시한 바와 같이 4개의 스트립이 일렬로 연결시킨 4열 스트립을 제작하였다. 또한, 상기의 진단 키트 제작과 같이, 각 병원체 별로 Nitrocellulose membrane에 goat anti-mouse IgG와 선발된 capture 항체쌍을 C선과 T선에 각각 분주한 후, 건조시켜 검출 membrane을 제작한다. 상기 조건에 따라 금나노입자가 결합된 항체쌍의 금나노입자 중합체를 중합체 패드에 분주한 후, 건조시켜 중합체 패드를 제작한다. 건조된 Nitrocellulose membrane에 중합체 패드를 부착시키고, 흡수패트와 시료 공급패트를 부착한 후, 0.6mm로 절단하여 검체패드를 완성하였다. 이들 각 병원체 패드를 상기의 4중 스트립에 각각 삽입하고 스트립을 조립함으로써 소설사병 병원체 4종을 동시에 진단할 수 있는 진단 키트의 제작을 완료하였다.



소 설사병 유발 병원체 다중 진단키트의 시제품 사진. A, 다중진단키트 시제품 겉모습. B, 다중진단키트 시제품 개봉 사진. C, 다중 진단키트 시제품 구성 내용

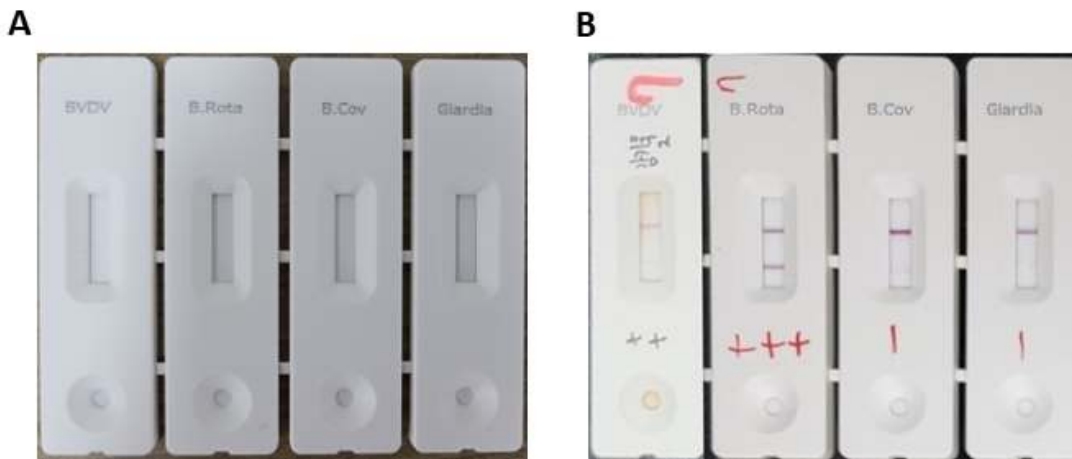
○ 소 설사병 유발 병원체 다중 진단 키트의 검사방법

검사방법은 샘플 채취용 면봉으로 분변을 채취하여 검체 분석용액이 포함된 샘플병에 넣고 분변이 추출될 수 있도록 면봉을 휘저어 준다. 그 후 큰 입자가 가라앉을 때까지 약 1분간 샘플병을 세워두고 상층 액을 4개 스트립의 점적홀에 3방울 정도 떨어뜨린 후, 10분간 기다린 후 결과를 판독한다. 검사 결과의 판독은 대조선(C)에 위치한 하나의 밴드만 나타나면 음성으로 판독하고, 대조선 위치(C)와 검사선 위치(T)에 두개의 밴드가 형성되면 양성으로 판정한다. 하기 도해10-B에 제시한 바와 같이, 양성으로 판명된 스트립의 종류를 확인함으로써 소 설사병 원인 병원체를 감별한다.

○ 송아지 설사증 진단 키트 유효성 검사

- 개발된 진단 키트 시제품의 유효성을 평가하기 위해 PCR 결과와 진단 키트의 결과를 비교하였다.
- 그 결과, 시제품에서 BRV에 대한 양성 검출률이 85.1%로 가장 높았고, BCV는 70.4%, *Giardia*는 61.5% 및 BVDV 검출률은 48.4%로 가장 낮았다.
- 반면 PCR 음성 시료의 검출률은 BCV가 6.7%로 위양성 결과가 가장 적었고, *Giardia*에서 44.0%로 위양성이 가장 많이 나타났다.

- 다중진단키트를 이용한 유효성 검증 결과가 상기의 개별 키트에 대한 임상결과와 비교했을 때, 일부 병원체에 있어 상당한 차이를 나타냈다. 특히, BCV 경우 개별 진단에서는 각각 98% 양성률 일치성을 보였는데 다중진단키트에서는 70.4%의 양성률 일치성을 보여주었다. 이는 검체 채취 및 검사법, 제한된 반복에 따른 결과로 보인다.
- 또한, 음성 검체의 경우, 확실히 병증이 없는 건강한 소의 검체물을 사용해야 하나, 본 연구에서는 병증이 있는 소들의 검체에서 PCR을 통해 반응이 없는 검체를 음성으로 사용함으로써 PCR 반응의 변량을 제외하지 못한 문제가 있다
- 무엇보다도, 총 연구기간이 1년 남짓 정도여서, 시제품 및 검체를 검증할 만큼 충분한 시간을 확보할 수가 없는 시간적 제약이 많아 추가적인 임상검증이 필요하였다.



송아지 설사증 병원체 다중 진단 키트 (A) 및 유효성 검증 예 (B)

<키트 유효성 검사 결과>

원인체	진단결과	PCR 결과	시제품 결과	PCR 대비 진단율 (%)
<i>Giardia</i>	양성	52	32	61.5
	음성	25	11	44
	합계	77	43	55.8
BVDV	양성	246	119	48.4
	음성	44	17	38.6
	합계	290	136	46.9
BRV	양성	148	126	85.1
	음성	17	7	41.2
	합계	165	133	80.6
BCV	양성	98	69	70.4
	음성	30	2	6.7
	합계	128	71	55.5

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

가. 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 설사증 송아지의 역학 조사를 통한 소 코로나바이러스(BCoV), 소 로타바이러스(BoRVA), 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV)의 유병률 조사 및 유전적 특성 분석
 - 국내 축산농가 및 각 도 동물위생시험소에서 분변, 혈액, 혈청 등 4826 검체를 수집하여 RT-PCR 및 real-time PCR로 유병률 조사
 - 분변에서는 *Giardia*가 28건 (3.3%), BVDV가 95건 (11.1%), BoRVA가 457건 (53.3%), BCoV 77건 (9.0%)이 검출되었고 혈액 검체에서는 65.6%, 혈청 검체에서는 35.5%가 BVDV에 감염되었음을 확인함.
 - 유전형 분석결과, BCoV의 경우 기존 국내에서 보고된 것들과는 유전적으로 차이가 있는 것으로 밝혀졌으며, BVDV의 경우 1b형이 48% 로 가장 많고, 2a형이 34%, 1a형이 19%고 가장 낮았다. BRV의 경우 G6P(5)가 전체 유병률 중 70%를 차지하였으며, *Giardia*는 양성 검체 중 96%가 assemblage E 형으로 드러났다.

 - 야외 바이러스(BCoV, BoRVA, and BVDV) 분리 및 배양
 - 유전형에 따른 야외분리주 확보하고 BCoV, BRV, BVDV 배양을 실시함
 - BVDV는 BVDV-1형 및 BVDV-2형을 분리 배양하여 항체 생성 및 항체단백질의 유효성 검증에 활용함.

 - BCoV, BoRVA, and BVDV 항원 진단키트 시제품 개발
 - BCoV, BRV 및 BVDV 재조합 항원단백질의 개발
 - BCoV, BRV, BVDV 및 *Giardia* 항체단백질의 개발 및 최적 항체쌍의 선발함
 - 개발된 BCoV, BVDV, BRV 항체단백질을 이용한 항원 진단키트를 개발하여 유효성을 평가함

 - 현재 시판중인 *Giardia duodenalis*의 기존 문제점을 보완한 시제품 제작
 - 시판중인 기존 제품은 유전형이 맞지 않음
 - 새로 개발한 *Giardia* 항체단백질을 기반으로 *Giardia* 항원 진단키트 개발
 - *Giardia* 양성 검체를 이용하여 기존 시판 중인 A사의 제품과 비교 분석한 결과, A사 제품에 비해 월등히 향상된 진단효과를 나타냄

 - BCoV, BoRVA, and *Giardia duodenalis* 와 BVDV 항원 진단키트 신속진단키트 개발
 - 새로 개발된 병원체 항원 진단 키트를 기반으로 4개의 스트립이 일렬로 연결된 다중진단키트 개발함
 - 소 설사병 유발 병원체의 다중 진단을 위해 최적의 효율적인 분석 용액 조건을 설정함.
-

-
- 체계적이고 효율적인 검체 채취 및 추출, 진단 방법의 구축
 - 시제품 개발함

○ 진단 키트 시제품에 대한 야외 임상 및 실증 시험을 통한 유효성 평가

- 개발된 진단 키트 시제품의 유효성을 평가하기 위해 PCR 결과와 진단 키트의 결과를 비교하였다.
 - 그 결과, 시제품에서 BoRVA에 대한 양성 검출률이 85.1%로 가장 높았고, BCoV는 70.4%, *Giardia*는 61.5% 및 BVDV 검출률은 48.4%로 가장 낮았다.
 - 반면 PCR 음성 시료의 검출률은 BCoV가 6.7%로 위양성 결과가 가장 적었고, *Giardia*에서 44.0%로 위양성이 가장 많이 나타났다.
 - 시제품의 유효성 평가의 신뢰성을 위해서는 좀 더 많은 시간을 갖고 정확히 검증된 시료를 바탕으로 검증을 추후 계속 진행할 것이다.
-

(2) 정량적 연구개발성과

- BRV의 신규 재조합 균주 G5P[7]의 발견과 관련된 연구결과를 대한수의학회 추계국제 학술대회 (2021년 10월 28일~30일에 개최)에서 발표하여 “우수 포스터상”을 수상함.

Full genomic characterization of the bovine-porcine reassortant G5P[7] rotavirus isolate detected in diarrheic calf from the Republic of Korea
 Hyung-Chul Cho¹, Seung-Uk Shin¹, Eun-Mi Kim¹, Jinho Park², Kyoung-Seong Choi^{1*}

¹Department of Animal Science and Biotechnology, College of Ecology and Environmental Science, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea
²College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea
 (*Corresponding author: kschal@knu.ac.kr)

Introduction

- Group A rotavirus (RVA) is widely known as one of the main pathogens causing neonatal calf diarrhea worldwide [1].
- The main characteristic of RVA is frequent recombination events in nature [2].
- Interspecies transmission is an important evolutionary process that facilitates the diversity in RVA strains [3].
- In this study, we performed full genomic analysis of an unusual strain, RVA/Calf-wt/KOR/KNU-GJ2/2020/G5P[7], detected in a 2-day-old neonatal calf with diarrhea.

Materials and methods

- Total RNA was extracted from fecal suspension using RNAiso Reagent (Takara, Tokyo, Japan).
- Real-time PCR for VP6 gene was performed to detect bovine rotavirus infection, and then was employed for amplification of VP1-4, VP6-7, and NSP1-5 genes by RT-PCR.
- All amplicons were sequenced and were included in phylogenetic trees.
- RVA genotypes for the 11 genome segments were assigned using the Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR, www.ViPRbrc.org) tool.
- The amino acid (aa) sequence comparison within the NSP4 gene was conducted using Multalin software (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).

Results

- By sequence analysis, genotype constellation of KNU-GJ2 was completely determined: G5-P[7]-I5-R1-C1-M2-A1-N1-T1-E1-H1.
- Of the eleven gene segments of KNU-GJ2, the VP3 was phylogenetically associated with bovine strains, and reassortant porcine and bovine strains, while other ten genes possessed the genotypes of porcine and porcine-like strains.
- According to the phylogenetic trees, KNU-GJ2 clustered with porcine strains K71 and OSU, and porcine-like strain KV0407 in the VP7 gene, and grouped together with porcine strain K71, porcine-like strain K5, and reassortant bovine strain KJ9-1 in the VP4 gene.
- In the VP6 gene, KNU-GJ2 was assigned to the I5d genotype with porcine strain K71, porcine-like strains KV0407 and K5, and reassortant bovine strains KJ11 and KJ44.
- There were amino acid (aa) sequence alterations in enterotoxin domain and interspecies variable domain region of the NSP4 gene: locations 114-135 and 131-141, respectively.
- Compared with other porcine and reassortant bovine strains belonging to the same genotype E1, KNU-GJ2 differed in four aa with porcine strains OSU and PRG9121, and in one aa change with porcine strains A253 and SB1A within these regions.

Table 1. Comparison of genotype constellation between KNU-GJ2, porcine strains OSU and K71, porcine-like strain K5, reassortant bovine strains K9-1, KJ11, and KJ44, and bovine strain NCDV. Yellow- and green-color belong to representative porcine and bovine genotype, respectively.

Strain	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Calf-wt/KOR/KNU-GJ2/2020/G5P[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M2	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/USA/OSU/1977/GSP[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Porcine-wt/KOR/K71/2006/GSP[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Cow-wt/KOR/K5/2004/GSP[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Cow-wt/KOR/KJ9-1/2000/GSP[7]	G6	P[7]	I2	R2	C2	M2	A1	N2	T1	E2	H1
RVA/Bovine-wt/KOR/K11/2006/GSP[7]	G8	H1/1	I5	H1	U1	M2	A1	N1	J1	E1	H1
RVA/Bovine-wt/KOR/K44/2006/GSP[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M2	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Bovine-wt/USA/NCDV/1971/GSP[7]	G6	P[7]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3

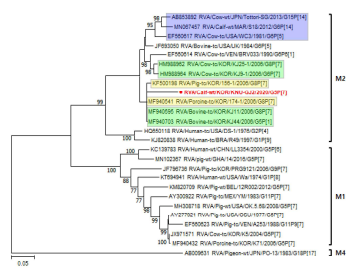


Figure 1. Phylogenetic tree of VP3 gene was constructed using the maximum-likelihood method of the MEGA-X software. KNU-GJ2 belonged to the M2 genotype and were closely related to reassortant bovine and porcine strains. Blue, yellow, and green box represent typical bovine strains, reassortant porcine strains, and reassortant bovine strains, respectively.

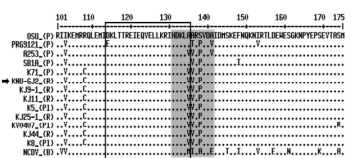


Figure 2. Amino acid (aa) sequences comparison of NSP4 gene of KNU-GJ2 have conducted with porcine strains (P), reassortant bovine strains (R), porcine-like strains (Pi), and bovine strain (B). This shows aa sequences alteration in enterotoxin domain and interspecies variable domain of NSP4 between KNU-GJ2 and porcine strains OSU, PRG9121, and SB1A.

Conclusions

- The unusual genomic constellation of KNU-GJ2 suggests the evidence of genomic reassortment occurred by interspecies transmission in the Republic of Korea (ROK).
- Our results support the importance of constant surveillance on reassortment events and genomic characterization of RVAs in the ROK for establishing effective vaccine strategies.

References

1. Rajendran P and Kang G. Molecular epidemiology of rotavirus in children and animals and characterization of an unusual G10P[15] strain associated with bovine diarrhea in south India. Vaccine 2014; 32: A89-94.
2. Slayter A, et al. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. J Gen Virol 2008; 89: 1690-1698.
3. Bwogi J, et al. Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains. PLoS One 2017; 12:e0178855.

〈대한수의학회 발표 포스터〉

- 소 설사병 관련 연구결과 2편 국제 학술지 발표
 - Jang DH, Cho HC, Shin SU, Kim EM, Park YJ, Hwang S, Park J, Choi KS. Prevalence and distribution pattern of Cryptosporidium spp. among pre-weaned diarrheic calves in the Republic of Korea. PLoS One. 2021 Nov 15; 16(11): e0259824.
 - Kim S, Yu DH, Jung S, Kang J, Park K, Chae JB, Choi KS, Kim HC, Park BK, Chae JS and Park J, Biological factors associated with infectious diarrhea in calves. Pak Vet J. 2021 Nov 22; 41(4): 531-537.

○ 소 설사병 병원체 다중 진단 키트 시제품 개발

A



B



C



소 설사병 유발 병원체 다중 진단키트의 시제품 사진

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계 (2021~2022)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허출원	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		1	1	20
	특허등록	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)				0
	SCIE 논문	목표(단계별)		1	1	0
		실적(누적)		2	2	0
	학술발표	목표(단계별)		0	0	0
		실적(누적)		2	2	0
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	제품화	목표(단계별)		0	0	20
		실적(누적)		1	1	20
	고용창출	목표(단계별)		2	2	20
		실적(누적)		3	3	20
	인력양성	목표(단계별)		0	0	0
		실적(누적)		2	2	0
	정책제안	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		1	1	20
계	목표(단계별)		3	3	100	
	실적(누적)		5	5	80	

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

(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	Prevalence and distribution pattern of Cryptosporidium spp. among pre-weaned diarrheic calves in the Republic of Korea	PLOS One	최경성	11	USA	Public library Science	SICE	2021.11.15	1932-6203	50
2	Biological factor associated with infectious diarrhea in calves	Pakistan Veterinary Journal	박진호	4	Pakistan	Faculty of Veterinary Science, Pakistan	SICE	2021.12.01	0253-8318	50

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
P-078	대한수의학회 2021년 추계국제학술대회	조형철	2021.10.28~ 2021.10.30	GS군산새만금컨벤션 센터	대한민국
P-102	대한수의학회 2021년 추계국제학술대회	장동훈	2021.10.28~ 2021.10.30	GS군산새만금컨벤션 센터	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	소 설사병 유발 바이러스 및 원생동물 다중진단 키트	대한민국	최동욱	2022.05.12	10-2022-0058564					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		

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.

○ 국제표준

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

- * 1) 국제표준 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					

사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		송아지 설사증 4종 신속 진단 키트 개발			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(천원)	1,300,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		0	2,300,000		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0	30%	
국외		0	3%		
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		BVDV 항원단백질을 이용한 지속감염우 신속진단키트 개발			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		0	309,000		
	수출	0	1,600,000		

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	송아지 설사증 4종 신속진단 키트 개발	(주) 보레다바이오텍	2	1	3
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	10
		생산인력	8
	개발 후	연구인력	12
		생산인력	10

□ 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

□ 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
1	제안	최근 국내 분리주를 이용한 소 코로나바이러스의 진단 키트 및 백신 개발	농림축산식품부	2022	

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				
		2022.02	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2			1	1			2		

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
		우수포스터상	우수발표내용	조형철	2021.10.29	대한수의학회

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

나. 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 송아지 설사 유발 바이러스 신속진단 제품 개발	○ 송아지 설사증 유발 4종 다중 진단 키트의 개발 완료	○ 100
○ 특허 출원	○ 소 설사병 유발 바이러스 및 원생동물 다중 진단 키트 특허 출원	○ 100
○ SCI 급 논문 발표	○ 소 설사증 관련 연구논문 2편 SCIE 급 학술지 발표	○ 100
○ 정책제안	○ 최근 국내 분리주를 이용한 소 코로나바이러스의 진단 키트 및 백신 개발 필요성 제안	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1) 기술적 측면

- 현장조기 진단 가능한 제품개발 기술력 확보
- 가축질병통제를 위한 데이터베이스 구축을 위한 기반 기술 확보
 - BCoV 전파 원인의 조기제거가 가능하여 우군의 전파를 차단할 수 있다.
 - BCoV를 조기에 진단할 수 있는 진단 시스템을 구축하여 시간과 경비를 절감할 수 있다.
- 유효항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보
- 현장에서 신속정확하게 조기검진 및 제어시스템 확보

2) 경제-산업적 측면

- 조기진단/제어시스템을 통한 축우산업 활성화 및 고부가가치 창출
 - 기존 진단법과 비교 시 시간, 비용 절감 효과
 - 본 다중진단 키트는 개발에 필요한 모든 원료 및 재료를 모두 국산화 함으로서 기존 제품에 비해 높은 가격 경쟁력을 가짐
 - 다중 진단키트의 국산화에 따른 수입대체 효과가 큼
 - 제품경쟁력 우위확보를 통한 시장우위 선점
 - 신시장창출: 현장검사를 통한 조기진단
 - 조기에 BCoV를 진단하여 축산물의 경쟁력에 이바지하고자 한다.
 - BCoV를 조기에 진단하고 예방책을 마련하므로서 송아지 설사 및 호흡기 질환에 의한 경제적 피해를 감소시켜 송아지의 생존율 및 생산성을 향상시키고, 젖소에서 유량생산 감소를 막으므로 농가의 소득 증대를 기대할 수 있다.
 - 제품경쟁력 우위확보를 통한 시장우위 선점
 - 본 연구 과제를 통하여 다양한 실험 및 장비숙지를 통하여 산업체에서 요구하는 우수하고 전문 지식을 가진 인력을 양성할 수 있다.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

가. 연구개발성과의 관리 및 활용

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

나. 연구개발성과의 사업화

(1) 사업화 전략

- 효율적인 개발기술 활용 및 제품개발 계획 수립
- 본 과제를 통하여 개발된 송아지설사병 다중 신속 진단 키트의 신속한 제품화 실시
 - 사용자의 편의성 및 효율성을 위해 신속진단키트의 형태를 개별병원체 단일 진단형태 및 다중진단 형태로 시제품 제작 완료하고 제품화 실시
 - 제품 설명서 및 부속품 선정 완료
 - 각 시제품을 임상평가 완료
- (주) 동방과 제품화를 위한 MOU 체결
- 농림축산검역본부에 제품의 인허가를 통한 국내외 판매 예정
- 현장활용형 BVDV 진단 키트 개발을 위한 후속과제 수행: 후속과제 수행을 통해, BVDV의 민감도와 특이도, 진단율등의 상승을 위한 새로운 항원단백질의 개발 및 항체 개발, 시스템의 체계화를 진행하고 있음.
- 기술개발의 평가 방법으로 검출한계, 반응시간, 민감도, 특이도에 대한 공인기관의 시험 진행하고, 타사제품과의 비교 검증실시

(2) 투자 계획

- 동물진단키트 전문업체인 (주) 바이오인디스트 인수 사업화 가속화
 - 2000년 설립된 동물복지를 위한 동물진단 및 사료 전문업체
 - 2003년 Canine 디스토펜(CDV) 진단키트 세계최초 개발 및 품목허가 획득

- 2007년 PRRSV 미국특허 획득(US Patent No. 7,449,296) 및 진단키트 세계최초 개발
 - 2008년 Canine 항체 사료 첨가물(Canine IgY) "CANIWELL" 세계최초 개발 및 시판
 - 2009년 면역증강기능 첨가 애완용 사료 개발
 - 2011년 PCV, CCV, CFV, CRV, CHW, CDVab, CPVab, FCV, FeLV, FIV, FHV 품목 허가획득
 - 2022 (주) 보레다바이오텍에 인수
- 사업화를 위한 투자 확대

구 분	사업화 년도		
	(2022)년 (개발종료 해당년)	(2023)년 (개발종료 후 1년)	(2024)년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품	송아지 설사증 다중 신속진단키트	송아지 설사증 다중 신속진단키트	송아지 설사증 다중 신속진단키트
투자계획 (백만원)	300	500	500

(3) 생산 계획

- 대량 생산: 하루 1만 테스트 이상의 생산을 위한 생산장비 도입
 - Auto-assembler
 - Autolaminator
 - Air-jet dispenser

(4) 해외시장 진출 계획

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

(5) 사업화에 따른 기대효과

- 기업 매출 증대 및 국산화에 따른 수입 진단 키트의 대체
- 기술개발을 통한 고용창출 및 신규인력 채용
 - 본 과제를 통한 기술개발의 파급효과로 제품 생산의 증대가 예상될 경우 신규인력 충원 필요
 - 사업화로 인한 매출 증대가 이루어질 경우 전문 연구인력 확보가 요구됨
 - 분야: 생산부, 시약 및 kit 개발, 항체공학, 생명정보학 등
- 안정된 고용유지 및 복리후생 확대

- 공동연구를 통한 신규연구인력 육성
- 주관기관과 공동개발기관의 연구개발 협력으로 인한 상호작용
- 공동개발기관의 학생 참여로 인해 과제 수행과 실무 교육을 병행

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.05.12
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2022-0058564 (접수번호 1-1-2022-0506338-03)
(DAS접근코드C941)
출원인명칭 주식회사 보레다바이오텍
대리인성명 위병갑
발명자성명 최동욱 신동호 박은지
발명의명칭 소 설사병 유발 바이러스 및 원생동물 다중진단 키트

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

RESEARCH ARTICLE

Prevalence and distribution pattern of *Cryptosporidium* spp. among pre-weaned diarrheic calves in the Republic of Korea

Dong-Hun Jang¹, Hyung-Chul Cho¹, Seung-Uk Shin¹, Eun-Mi Kim¹, Yu-Jin Park¹, Sunwoo Hwang¹, Jinho Park², Kyoung-Seong Choi^{1*}

1 Department of Animal Science and Biotechnology, College of Ecology and Environmental Science, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea, **2** College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

* kschoi3@knu.ac.kr



Pakistan Veterinary Journal

ISSN: 0253-8318 (PRINT), 2074-7764 (ONLINE)

DOI: 10.29261/pakvetj/2021.078

RESEARCH ARTICLE

Biological Factors Associated with Infectious Diarrhea in Calves

Suhee Kim¹, Do-Hyeon Yu², Sukhan Jung³, Jinhee Kang⁴, Kwangman Park⁴, Jeong-Byoung Chae⁵, Kyoung-Seong Choi⁶, Hyeon-Cheol Kim⁷, Bae-Keun Park⁸, Joon-Seok Chae⁵ and Jinho Park^{4,*}

¹Department of Internal Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University Hospital, Jinju 52727, Republic of Korea; ²College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea; ³National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea ⁴College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea; ⁵Laboratory of Veterinary Internal Medicine, BK21 PLUS Program for Creative Veterinary Science Research, Research Institute for Veterinary Science and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea ⁶College of Ecology and Environmental Science, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea ⁷College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea ⁸College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea
*Corresponding author: jpark@jbnu.ac.kr

주 의

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