

1
2
2
0
1
1
-2

유전체 빅데이터 및 신속대응기술개발 국제협력연구
차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카 돼지열병바이러스

최종보고서 2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004671-01

차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카 돼지열병바이러스 유전체 빅데이터 및 신속대응기술 개발 국제협력연구

2024.06.18

주관연구기관 / 연세대학교
공동연구기관 / 클라우드 9
공동연구기관 / (주)씨티씨백

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카돼지열병바이러스 유전체 빅데이터 및 신속대응기술 개발 국제협력연구”(개발기간 : 2022.04.01. ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024.06.18

주관연구기관명 : 연세대학교 원주산학협력단 기 재 홍 (인)



공동연구기관명 : 클라우드 9 홍 금 자 (인)



공동연구기관명 : 주식회사 씨티씨백 성 기 홍 (인)



주관연구책임자 : 전 보 영

공동연구책임자 : 권 태 수

참여기관책임자 : 원 용 관

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

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술고도화 지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)	국내외 신변종바이러스 협력체계 구축			연구개발과제번호		122011-2
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710	60%	LB0701	40%	%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	80%	RB0299	20%	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)						
연구개발과제명	차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카돼지열병바이러스 유전체 빅데이터 및 신속대응기술 개발 국제협력연구					
전체 연구개발기간	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월)					
총 연구개발비	총 1,044,800 천원 (정부지원연구개발비: 968,000 천원, 기관부담연구개발비 : 76,800천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계	기초[] 응용[■] 개발[] 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	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세계적으로 축산업에 엄청난 타격을 입히고 있는 아프리카 돼지열병은 국가적인 재난을 야기할 수 있어 아프리카 돼지열병에 대하여 신속·정확하게 대처하기 위하여 국내 및 전 세계적으로 발생하고 있는 아프리카돼지열병 바이러스에 차세대염기서열분석법을 이용한 유전체 빅데이터 분석과 이를 이용하여 아프리카돼지열병 유전형 및 변이에 따른 신속·정확한 진단법과 백신개발을 할 수 있도록 국제적인 협력을 통해 대처하는 것을 목표로 함 ○ 아프리카돼지열병 바이러스에 대한 유전체 데이터 베이스를 구축하여 진단 마커 및 방어면역 마커 발굴을 통한 신종·변이 genotype에 대한 진단법 개발 및 예방백신 플랫폼 개발 				
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) 전장유전체(WGS) 데이터 생산 조건 최적화 및 표준운영절차 개발 ○ NGS 기반 ASFV 데이터 분석 파이프라인 구축 ○ ASFV 분리주 전장유전체 분석 ○ 임상검체에서 ASFV의 NGS 데이터 생산 및 분석 ○ ASFV 유전자 정보 데이터베이스 구축 ○ ASFV 유전체 분석을 통한 병원성 및 전파경로 분석 ○ ASFV Genome sequencing project와 연계하여 상시 감시체계 시스템 제시 ○ ASFV 진단관련 돌연변이 비교분석을 통한 진단마커 발굴 ○ ASFV 진단마커를 이용한 개선된 현장진단 기술 개발 ○ ASF 임상검체를 통한 개선된 검사법의 유용성 평가 ○ ASFV 방어유도 유전체 분석을 통한 백신후보 발굴 ○ ASFV 백신후보물질 제작 및 방어면역 평가 ○ ASFV 백신후보물질에 대한 공격접종을 통한 예방효과 평가 				

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) 전장유전체 데이터 생산 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 shot gun 시퀀싱 방식 - 아프리카돼지열병 바이러스 캡처 방식 전장유전체 시퀀싱 방식 - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 AmpliSeq 시퀀싱 방식 개발 ○ ASFV 데이터 분석 파이프라인 구축 <ul style="list-style-type: none"> - ASFV assembly - ASFV gene annotation - ASFV genotype and phylogenetic analysis ○ ASFV WGS 시퀀싱 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 ASFV 분리주 대상 - 세계 ASFV 분리주 대상 ○ ASFV Genome DB 구축 ○ ASFV 유전체 기반 real-time PCR 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 진단마커에 대한 real-time PCR용 primer 및 probe 제작 - ASFV real-time PCR 진단법 제작 최적화 - ASFV DNA를 이용한 ASFV real-time PCR 진단법 유효성 평가 ○ ASFV 유전체 기반 등온 증폭용 LAMP 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 진단마커에 대한 신속 검출용 LAMP용 primer 및 probe 제작 - 신속 검출용 LAMP 진단법 제작 최적화 - ASFV DNA를 이용한 신속 검출용 LAMP 진단법 유효성 평가 ○ ASFV 진단마커를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 진단마커에 대한 신속 검출용 real-time RPA용 primer 및 probe 제작 - 신속 검출용 real-time RPA 진단법 제작 최적화 - ASFV DNA를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 유효성 평가 - 해외(러시아)야외검체를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 유효성 평가 - 해외(러시아) 신속 검출용 real-time RPA 키트제작 및 사용법 제작 ○ ASFV 유전체 기반 백신후보 단백질 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 식물기반 P30-CD2v 융합단백질 발현시스템 개발 												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아프리카돼지열병 바이러스에 대한 NGS기반 유전체 분석을 통해, 아프리카돼지열병바이러스의 유래, 시간적 및 지역적 이동 특성 규명에 활용 ○ 아프리카돼지열병 빅데이터 분석기반 아프리카돼지열병 발생 상시 감시체계 시스템 제공 ○ 아프리카돼지열병 돼지 발생에 대한 상시 감시체계 시스템 제공 ○ 민감한 현장진단 기술개발을 통한 부가가치 창출 ○ 본 연구개발을 통해 구축한 플랫폼을 이용해 신속한 감염병 진단/백신 개발로 수입대체효과 및 해외 수출 증진 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
	1	2						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)	아프리카돼지열병		유전체	차세대염기서열 분석법		유전자형	진단/백신마커						
영문핵심어 (5개 이내)	African swine fever		Genome	Next generation sequencing		Genotype	Dignosis / Vaccine marker						

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 필요성

■ 아프리카 돼지열병과 원인체

○ 아프리카 돼지열병은 치사율이 매우 높고 출혈이 특징적인 돼지의 전염병으로 국제수역사무국(OIE)이 지정한 중요 돼지 질병이자 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류되어 있음.

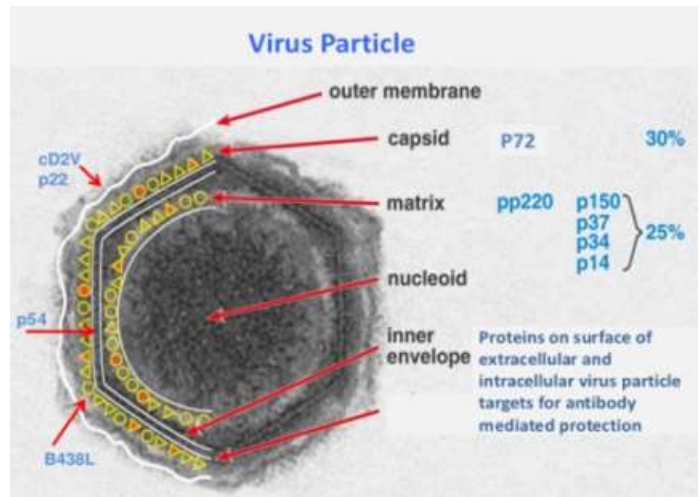
○ 아프리카 돼지열병 원인체

- 원인체는 아프리카돼지열병바이러스(ASFV, African swine fever virus)는 아스파바이러스과(*Asfarviridae*), 아스피바이러스속(*Asfivirus*)에 속하는 약 200nm정도의 DNA 바이러스임.

- ASFV는 유전자 염기서열분석을 통하여 총 22개의 유전형(genotype)으로 구분되어 있음.

- 바이러스에 50개 이상 구조 단백질(Structure protein)로 구성되어 있으며 림프조직에 친화성이 높아 단핵구, 대식세포가 표적이 됨.

- 바이러스 단백질은 공통적으로 구조 단백질인 p32, p62, p54 및 p72의 단백질들과 capsid 구성 단백질이라고 알려진 VP72/73 단백질의 항원성이 높은 것으로 알려져 있음.



<그림 1> 아프리카 돼지열병 바이러스 구조 및 주요 단백질

- 기존의 해외에서 VP72/73을 이용한 ELISA kit와 p32, p62 및 p72을 이용한 ELISA kit가 상용화 되고 있음.

○ 아프리카 돼지열병의 자연숙주

-아프리카지역의 야생돼지인 흑멧돼지(Wartog), Giant froset hog, bushpig는 ASFV에 감염되어도 임상증상이 없으며 ASFV의 자연숙주로서 전파역할을 하고 있음.

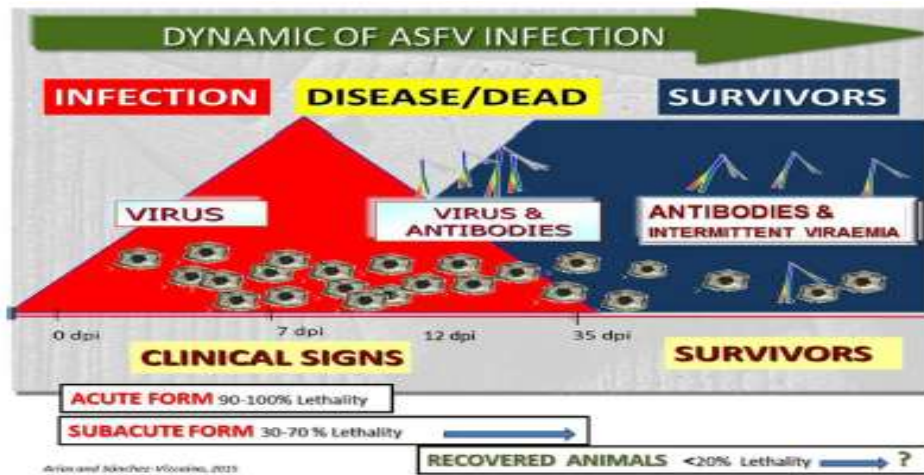


<그림 2> 아프리카 돼지열병의 전파

- ASFV는 또한 진드기에 의해 전파될 수 있는 절족동물매개성 질병임. 참진드기 중 오르니토도로스(Ornithodoros)속의 연진드기(soft tick)가 매개함.
- 아프리카 돼지열병 바이러스를 매개하는 연진드기는 지금까지 Species 별로 서식지가 구별되어 있음.
- 아프리카 발병 지역에서는 야생돼지-연진드기-일반식용돼지 사이의 감염고리가 형성되어 있어 전파되고 있으며, 연진드기가 없는 지역에서는 감염된 돼지와 건강한 돼지와의 접촉에 의한 전파가 이루어지고 있음.

■ 아프리카 돼지열병 바이러스 발병기전

- ASFV는 숙주에 감염된 후, 편도와 악하임파절 내의 단핵세포(monocyte)와 macrophage에서 1차 증식과정을 거침.
- 증식된 바이러스는 혈류를 타고 2차 증식장소인 다양한 림프절, 골수, 비장, 폐, 간, 신장 등으로 이동함.
- 바이러스혈증은 일반적으로 약 4-8일 정도이지만, 숙주동물이 중화항체를 생성하지 못하면서 수주 내지 1개월 이상 지속되기도 함.



<그림 3> 아프리카 돼지열병의 진행과정

- 또한 ASFV는 적혈구와 혈소판에 작용하여 혈구흡착(hemadsorption)을 유발하기도 함.

■ 아프리카 돼지열병의 발생상황

○ 아프리카 돼지열병 최초 발생

- 아프리카 돼지열병은 1921년 아프리카 케냐에서 야생아프리카 멧돼지(Wild african suids)로부터 집에서 사육되는 돼지에 전파되어 발생하였음 (Montgomery, 1972).
- 1970년 대 쿠바, 브라질, 도미니카 공화국 및 하이티 등에서 아프리카 돼지열병이 발생하였으나 강력한 박멸대책으로 근절되었음.
- 아프리카 사하라사막 이남의 지역인 우간다, 탄자니아, 나이지리아, 남아프리카 공화국 등 28개국에서는 아직까지 산발적으로 발생하고 있음.

○ 아프리카 돼지열병 바이러스의 서유럽으로의 전파

- 1957년 아프리카 돼지열병은 아프리카의 앙골라 지역에서 포르투갈 리스본으로 유입되었음.
- 포르투갈의 리스본에 아프리카 돼지열병이 발생한 이후 서유럽으로 전파되었음.
- 당시 100% 폐사하는 무서운 돼지전염병이 발생하게 되었음(Manso Ribeiro 등, 1958)
- 포르투갈에서 발생한 지 3년 후에 스페인에서 다시 발생하였음.

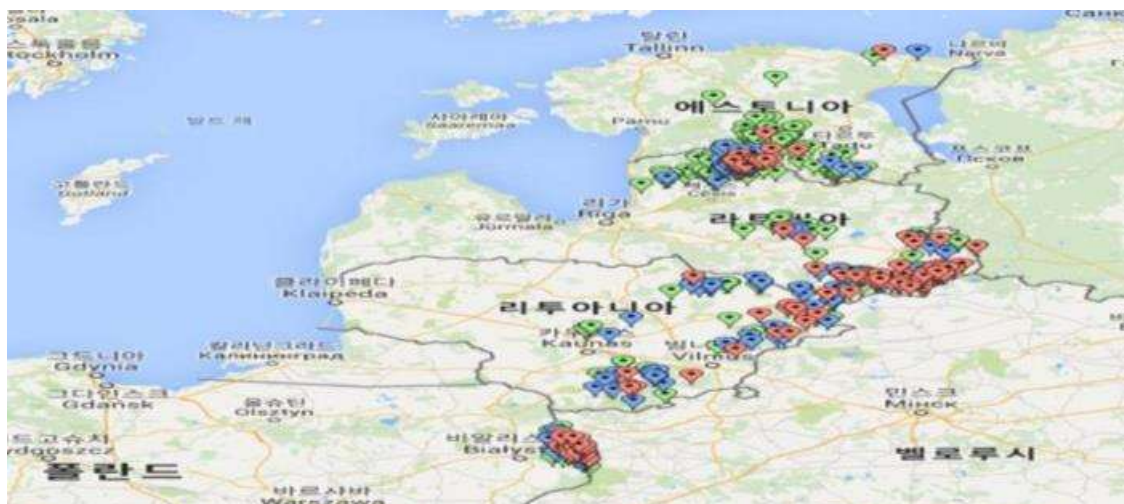


<그림 4> 아프리카 돼지열병의 발병지역

- 또한 1964년에 프랑스에서, 1967년에 이탈리아, 1978년 말타, 1985년 벨기에, 그리고 1986년에 네덜란드에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 서유럽 전체에 전파되어 발생하였음.
- 특히 포르투갈과 스페인에서는 1995년까지 약 40년간 발생하였으며, 강력한 박멸전략을 통해 아프리카 돼지열병 근절을 하였음.

○ 러시아 지역으로의 확산

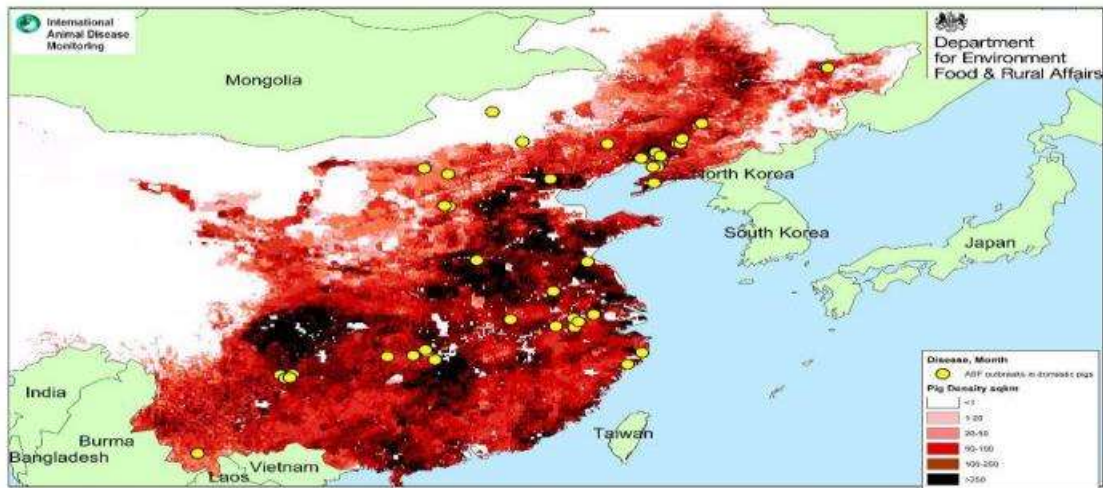
- 2007년 러시아 및 코카서스(흑해와 카스피해 사이에 있는 구소련 지역)에서 아프리카 돼지열병이 발생하였음.
- 2008년 체첸, 그루지아, 아제르바이잔에서도 발생하였음.
- 2007년 조지아(Georgia)지역에서 발생한 아프리카 돼지열병은 역학조사 결과 남부 아프리카에서 선박으로 유래된 잔반을 돼지에 먹여 발생되었으며, 매년 350km씩 동북진하고 있는 것으로 발표하였음.
- 러시아와 인근 국가인 에스토니아, 라트비아, 벨라루스, 리투아니아, 루마니아, 체코에서는 2007년 발생 이후 아직까지 산발적으로 발생하고 있음.
- 러시아에서는 2011년 아프리카 돼지열병 박멸을 위해 약 4억달러(약 4천400억원)의 경비를 투입하고 있음.
- 2013년 11월 러시아와 중국의 국경지역인 Amur지역에서 아프리카 돼지열병이 발생하였음.



<그림 5> 러시아와 주변국가에서 아프리카 돼지열병의 발병상황

○ 중국 등 주변국에서의 발생

- 2018년 8월 1일 중국 랴오닝성 선양시 선베이신구 소재 양돈장에서 감염된 돼지 47마리가 모두 폐사하였음.
- 중국 방역당국 검사결과 아프리카 돼지열병으로 진단되었으며, 발생농가 및 인근 3 km 이내의 모든 돼지 8천 116두를 살처분하였음.
- 바이러스를 분리하여 유전자 검사결과 러시아에서 발생한 유전형과 100% 일치하였으며, 러시아와 동유럽에서 현재 발생하고 있는 그루지아변종에 속하는 것이 확인되었음.
- 중국은 31곳의 성·구·직할시 가운데 25곳에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 전국적으로 퍼져있음.
- 2019년 2월 19일 영국 로이터통신 등에 의하면, 베트남 전역의 8개 돼지 사육농장에서 아프리카 돼지열병이 발병하였다고 함. 구체적인 발생지역은 베트남 북부 흥옌(Hung Yen)과 타이빈(Thia Binh) 지역이며, 베트남 수도인 하노이에서 직선거리로 25-26km 떨어진 곳임. 베트남 정부는 이 지역 농장들의 돼지를 모두 살처분 하였음.



<그림 6> 중국에서 아프리카 돼지열병의 발병상황 (FAO 자료)

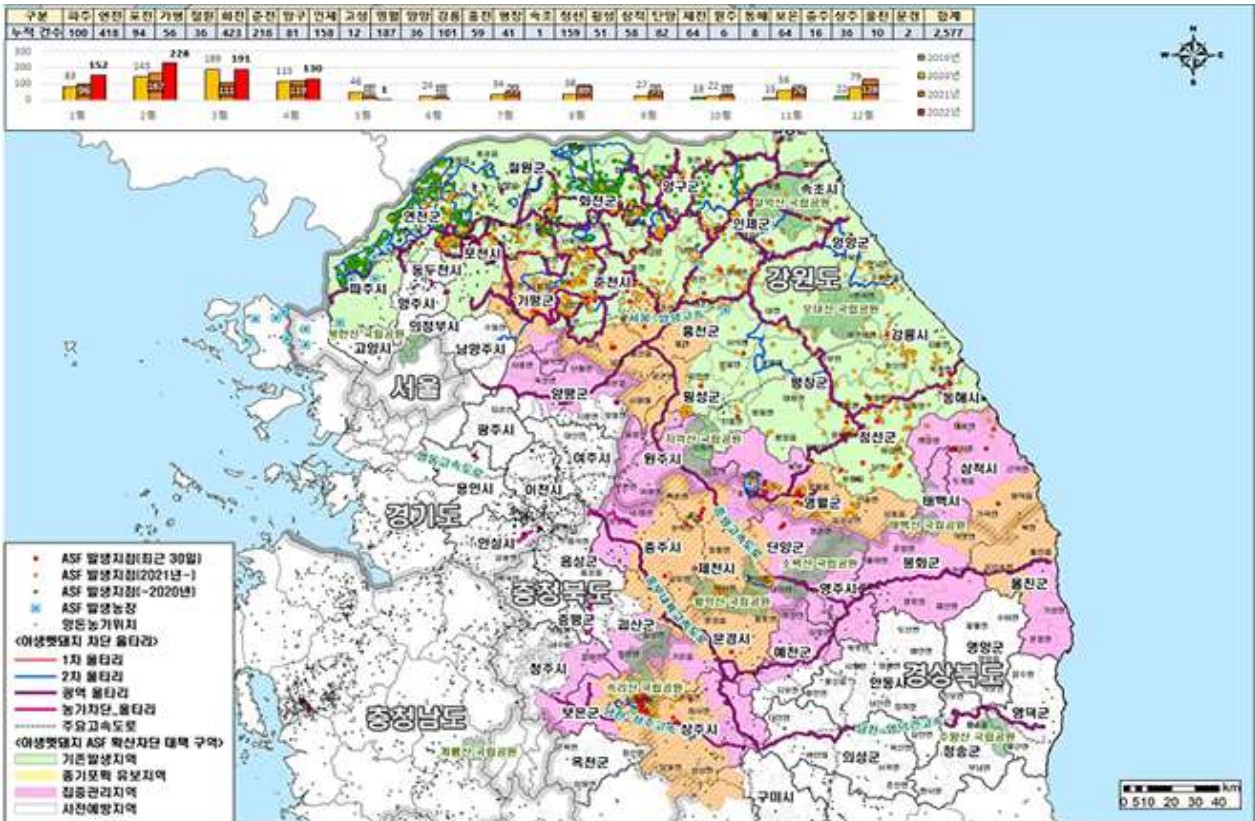
- 2018년 중국에서 아프리카 돼지열병이 처음으로 발생한 이후 북쪽 몽골과 남서쪽 베트남 등으로 거침없이 전파되고 있는 상황임.
- 유엔식량농업기구(FAO)는 최근 베트남에서 아프리카 돼지열병이 발생한 직후 ‘베트남과 국경이 맞닿아 있는 라오스·캄보디아·태국으로 확산되었고, 필리핀, 인도네시아 등에도 전파되었음.
- 현재 아프리카 돼지열병 발생국은 중국, 베트남 등과 우리나라를 포함하여 12개국임.

<표 1> 아프리카 돼지열병의 발생국가

대륙	발생국
아시아	중국, 몽골, 베트남, 인도네시아, 캄보디아, 북한, 라오스, 미얀마, 동티모르, 한국, 필리핀, 태국
아프리카	가나, 기니비사우, 나미비아, 나이지리아, 남아프리카 공화국, 르완다, 마다가스카르, 말라위, 말리, 모잠비크, 베냉, 부룬디, 부르키나파소, 세네갈, 앙골라, 우간다, 잠비아, 중앙아프리카공화국, 짐바브웨, 차드, 케메룬, 카보베르데, 케냐, 코트디부아르, 콩고공화국, 콩고민주공화국, 탄자니아, 토고
유럽	라트비아, 러시아, 루마니아, 리투아니아, 몰도바, 에스토니아, 우크라이나, 이탈리아, 체코, 폴란드, 헝가리

○ 국내 아프리카돼지열병 발생상황

- 경기도 내 돈사에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 발생농가 및 주변농가에 대한 살처분 또는 방역정책을 현재 사육돈에서는 발생하고 있지 않음
- 경기도 및 강원도 북부 지역을 중심으로 휴전선 부근에서 멧돼지에서 아프리카 돼지열병이 발생하고 있을 뿐 아니라 지속적으로 발생지역이 남부지역으로까지 넓어지고 있어, 사육돈으로 전파를 통한 발생이 우려하여 방역을 실시하고 있는 상황임



<그림 7> 국내 아프리카 돼지열병의 야생멧돼지에서 발병상황

■ 아프리카 돼지열병의 임상증상

○ 일반적인 특성

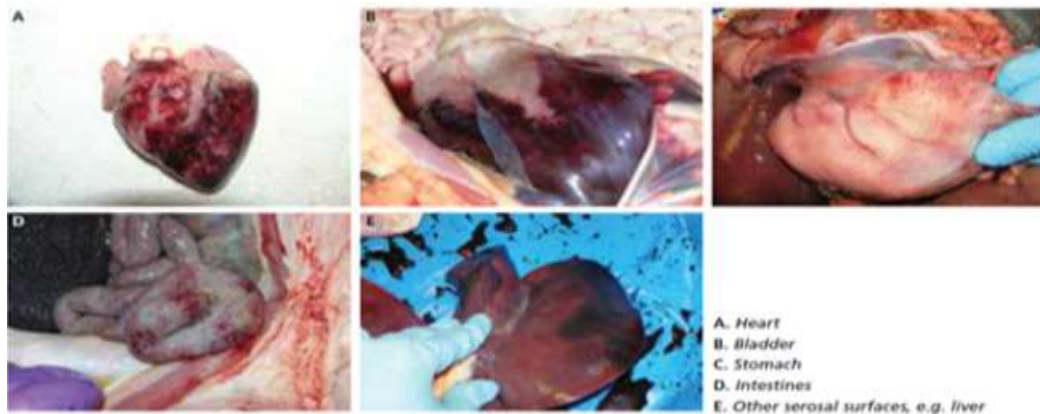
- 아프리카 돼지열병의 일반적인 특징은 모든 연령의 돼지가 감염될 수 있고 감염된 돼지들이 갑자기 폐사하는 것임
- 특히 어떤 국가나 지역에 최초로 발생하는 경우 보통 짧은 열성질환 후 높은 폐사율이 나타나는 것이 특징임. 그러나 발생 초기에 특히 이환된 돼지의 수가 적을 때는 진단이 쉽지 않고 발생이 없던 농장에 소량의 바이러스가 감염되었을 때는 발열과 약간의 출혈성 림프절이 있으면서 폐사하는 것을 제외하고는 높은 폐사율을 일으키지도 않을 뿐만 아니라 특징적인 임상 증상도 안 나타날 수 있음.



<그림 8> 아프리카 돼지열병에 의한 증상과 병변

○ 아프리카 돼지열병의 임상증상 및 병변

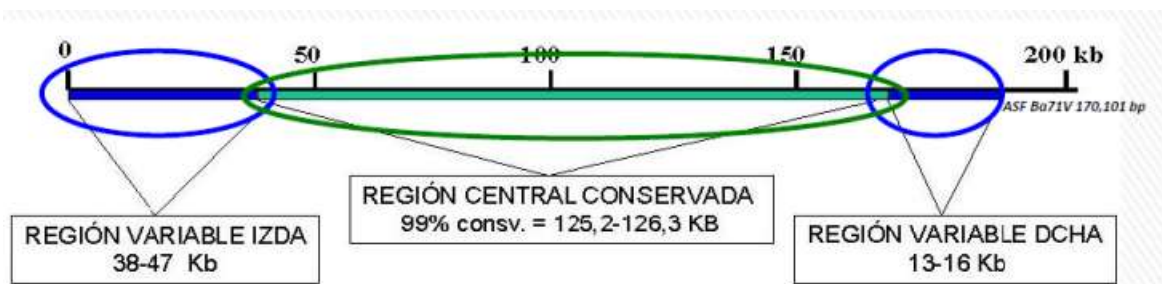
- 아프리카 돼지열병의 임상증상은 바이러스의 병원성, 감염된 돼지의 품종, 바이러스 노출 경로, 감염량 및 그 지역에서의 풍토병 상태 등과 같은 요인들에 따라 임상증상과 병리학 적 병변이 다양하게 나타날 수 있음.



<그림 9> 아프리카 돼지열병에 의한 출혈성 병변

■ 아프리카 돼지열병 바이러스 유전체

- 아프리카 돼지열병 바이러스는 이중가닥 DNA바이러스로서, 게놈의 길이는 분리주에 따라 약 170~193kbp이며 150~167개의 오픈 리딩 프레임을 포함하고 있음.
- ASFV 게놈은 왼쪽 가변 영역(LVR, 38-48kb), 중앙 보존 영역(C 영역, 약 125kb) 및 오른쪽 가변 영역(RVR, 13-22kb)으로 나눌 수 있음



<그림 10> 아프리카 돼지열병 바이러스 유전체 구조

- ASFV는 높은 수준의 유전적 다양성을 가지고 있으며, ASFV는 B646L 유전자에 기초하여 24개의 유전자형으로 분류되고 있음. 교차 보호된 ASFV 균주는 항체 매개 혈액흡착 억제에 따라 8개의 혈청군으로 나눌 수 있음
- ASFV 게놈의 끝에 위치한 다유전자 패밀리(Multigenic family)를 가지고 있음. ASFV 게놈

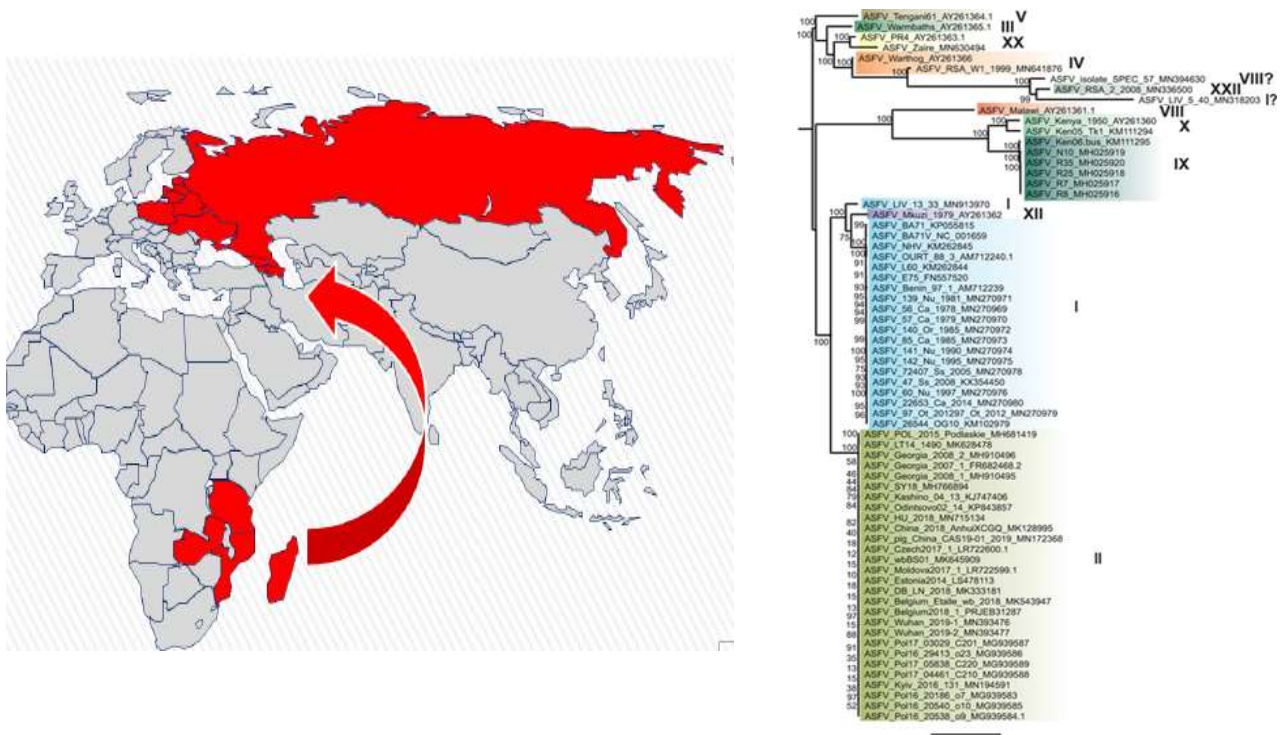
의 약 30%는 유사 유전자 세트인 MGF100, 110, 300, 360, 505/530 및 p22를 인코딩하며, 각각 계놈당 여러 사본을 가지고 있음.

- 생물정보학적 분석 방법에서 ASFV 균주 사이에 MGF 영역에서 상당한 차이를 갖는다는 것을 밝혀졌는데, MGF 암호화 단백질의 일부 기능과 구조를 예측하는 데 사용될 수 있음.
- "Estonia-2017" 균주는 멧돼지에서 분리되었으며 계놈의 5' 영역에 큰 결실이 있어 MGF110 영역의 많은 부분이 손실되어 있음. "Estonia-2017"은 동물 공격 시 감소된 수준의 병원성으로 발현된 다른 ASFV 균주와 상당한 차이가 있음. 이는 바이러스 병원성에서 MGF 110의 잠재적 기능을 나타내는 것으로 보임.
- ASFV의 MGF 구성원의 또 다른 면은 바이러스의 면역 회피 메커니즘 중 하나가 될 수 있는 세포자멸사 과정 조절하는 것으로 알려져 있음.
- ASFV 유전자형 분석은 일반적으로 바이러스 계놈에서 가장 가변적인 것으로 간주되는 다음 유전자 세트를 시퀀싱하여 수행됨.



<그림 11> 아프리카 돼지열병바이러스의 genotype 분류

- B646L(P72)(7); B602L(CVR)(8); E183L(P54)(9), CP204L(P30)(10), I73R과 I329L(11) 사이의 유전자간 영역(IGR) 내 tandem repeat sequence(TRS), CD2v-인코딩 유전자(EP402R)(10), 티미딘 키나제(TK) 유전자(12), J268L(13), Bt/Sj(13), KP86R(13) 및 O174L 유전자(14) 및 C315R/C147L 영역(15)을 시퀀싱하여 genotype을 분류하고 있음
- 이렇게 많은 유전자 세트에도 불구하고, 염기서열을 기반으로 바이러스의 특성을 예측하는 것은 종종 불가능한 경우도 있음

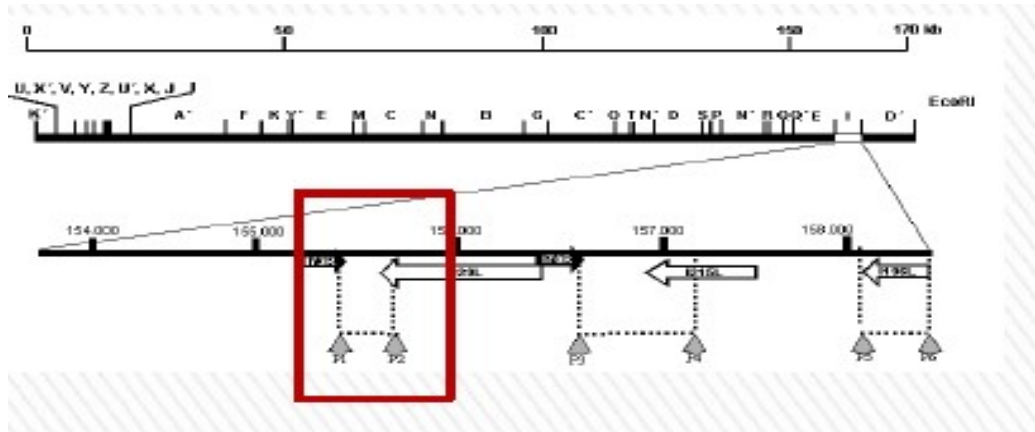


<그림 12> ASFV genotype II의 전파 지역

- 최근에 발생하고 있는 유럽아시아 지역의 ASFV는 모두 p72 genotype II로 분류되고 있음.

ASFV genotype II는 2007년 Georgia에 유입되어 러시아, 동유럽, 중국, 아시아지에 전파되어 발생하고 있음.

- c-term p72 및 전체 p54 유전자 서열에서 100% nt/aa 상동성을 분석하였을 때, 2007년 이후 중앙 및 동부 유럽에서 나온 모든 ASFV 분리주에 대한 분석에서 유전자형 II 분리체 간의 CVR 내 고유하고 동일한 TRS 패턴을 보여 동일한 genotype으로 보여짐.
- 이러한 문제를 해결하기 위하여 새로운 genotyping marker의 개발이 필요함



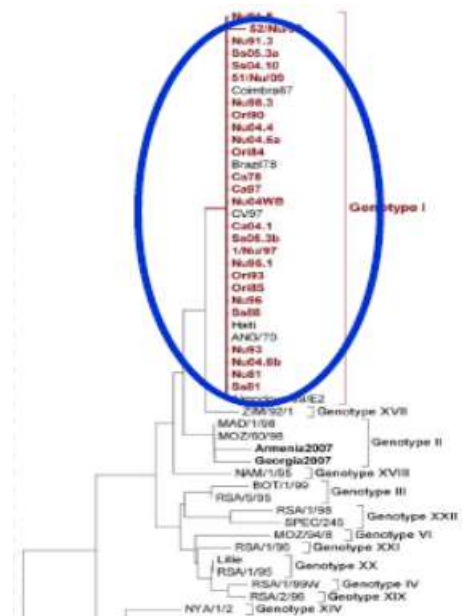
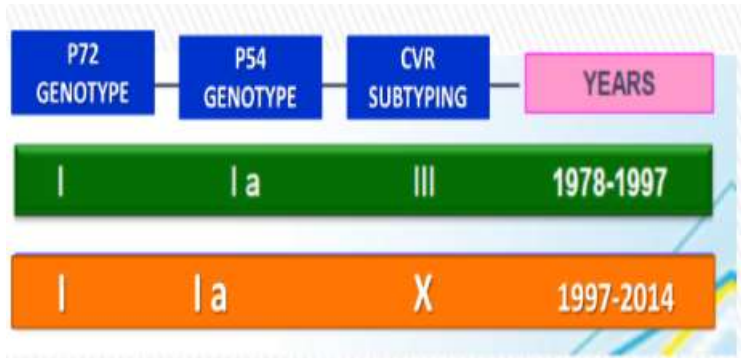
<그림 12> ASFV genotype 분류를 위한 target region

- 새로운 유전자 표지, I73R/I329L intergenic region을 타겟으로 유럽과 아시아에서 분리된 ASFV isolates를 조사하였을 때, 2013 Belarus와 2012 Ukraine 균주간에 차이가 있음을 발견하였음.
- 이를 통해 새로운 genotyping을 할 수 있는 target region을 발견하였음.

Strain	Sequence (approx. 130 bp)
Georgia2007	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Abi07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Arm07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Che07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Az09D	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Az09E	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Ing08	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Oren08	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
NC08.Av	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
NC08.Ap	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Dagestan08	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
StPet09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Kaimy1009	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Ratev09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Tver0511/Torjo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Tver0312/Torjo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
M112Zapp0	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Tver0712/Les	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Tver0812/Belo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Bel13/Grodno	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
L1141401	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
L1141402	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Pol14/51	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT
Pol14Krus	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA-----GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAACTACTAAT

<그림 13> ASFV genotyI73R/I329L intergenic region을 타겟으로 한 ASFV genotyping

- ASFV p72 genotype I
 - 야생멧돼지와 집돼지에서 1978년에 전파된 이후 발생하고 있음.



<그림 14> ASFV genotype I의 pattern과 연관성 분석

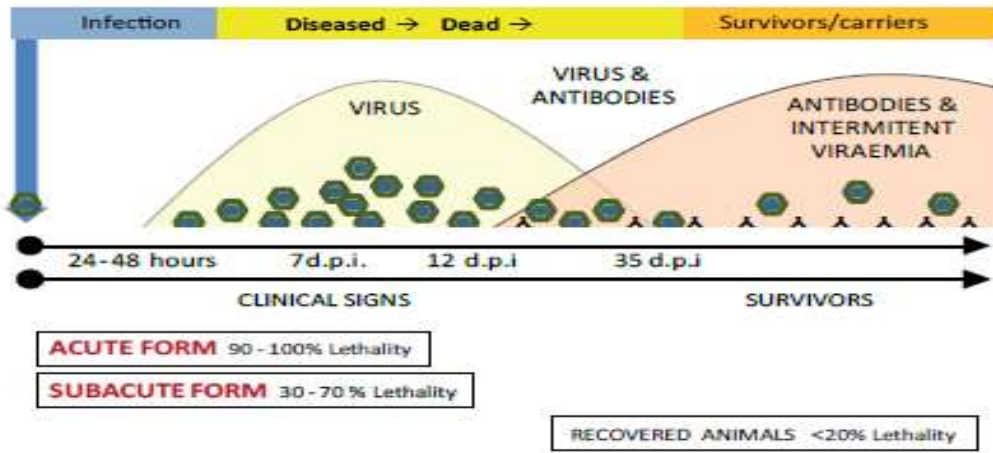
- ASFV p72 genotype I의 경우에는 분리된 바이러스 주에서 genetic 변이가 B602L CVR에 대한 조사에서 거의 없는 것으로 보고되어 있음.

<표 2> ASFV 대표적인 genotype I과 genotype II 참고주

COUNTRY	YEAR	P72 GENOTYPE	CVR SUBTYPING	INTERGENIC SUBTYPING
Georgia	2007	II	GII-CVR1	GII-IGR1
Armenia	2007	II	GII-CVR1	GII-IGR1
Azerbaijan	2008	II	GII-CVR1	GII-IGR1
Russia Federation	2007-2012 (EURL)	II	GII-CVR1	GII-IGR1
	2012-2015 (Pokrov)	II	GII-CVR1	GII-IGR1 + GII-IGR2
Ukraine	2012, 2015	II	GII-CVR1	GII-IGR2
Belarus	2013	II	GII-CVR1	GII-IGR2
Lithuania	2014-2015	II	GII-CVR1	GII-IGR2
Poland	2014-2015	II	GII-CVR1	GII-IGR2
Latvia	2014-2015	II	GII-CVR1	GII-IGR2
Estonia	2014	II	GII-CVR1	GII-IGR2
	2015	II	GII-CVR1 + GII-CVR2	GII-IGR2
Sardinia	1978-1997	I	GI-CVRIII	
	1997-2015	I	GI-CVRX	

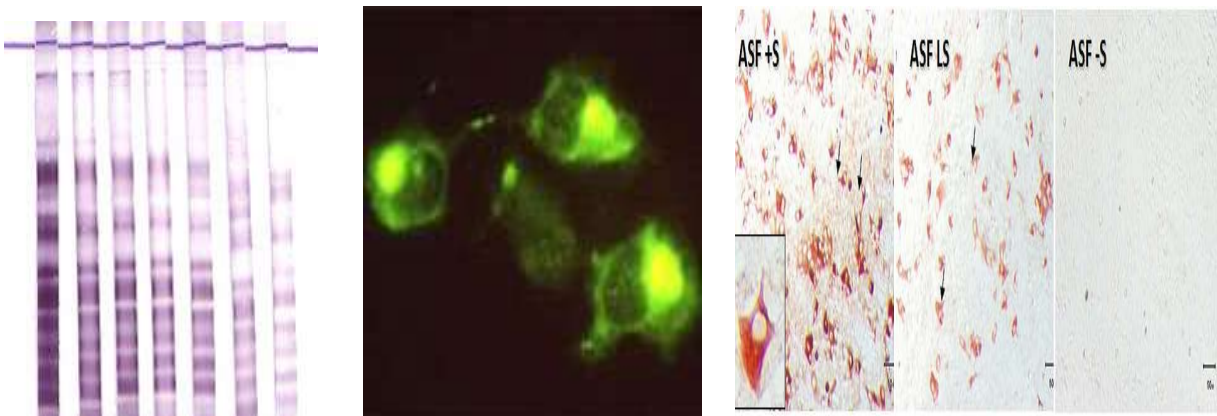
■ 아프리카 돼지열병 실험실 진단

- 아프리카 돼지열병에 대한 백신이 없기 때문에 신속하고 정확한 진단이 아프리카 돼지열병에 대한 방역 및 관리에서 제일 중요함.
- 아프리카 돼지열병에 감염된 시기에 따라 실험실 진단법의 선택이 중요하며, 시기에 따라 바이러스 항원을 검출하는 검사를 할지 아니면 바이러스에 대한 항체를 검출하는 검사를 할지 선택하여야 함.



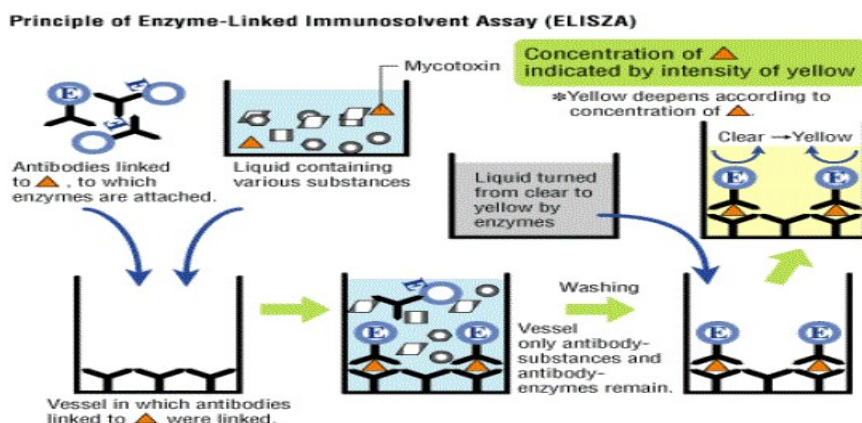
<그림 15> 아프리카 돼지열병 바이러스 감염 시기에 따른 변화

- 바이러스 검출법으로는 PCR을 비롯하여 직접면역형과법(DIFT), 항원 검출 ELISA 등이 있음.
- 아프리카 돼지열병에 감염된 돼지의 혈청을 이용한 항체 검출법은 OIE-ELISA(간접법)와 상용화된 항체검출용 ELISA를 이용하여 1차 선별검사를 진행하고, 면역탁본법(IB), 면역과산화효소시험(IPT, Indirect Immunoperoxidase tests), 간접형광항체법(IFA, Indirect Immunofluorescence tests)를 통해 최종적으로 확인할 수 있음.



<그림 16> 아프리카 돼지열병에 대한 검사법(IB, IFA, IPT)

<장·단점> ASFV에 대한 IB, IFA, IPT 검사법은 숙련된 전문인력이 필요하며, 국가방역기관에서 확진검사용으로 적합하며, 현장검사용으로는 부적합함.



<그림 17> 아프리카 돼지열병에 대한 항체검출용 ELISA

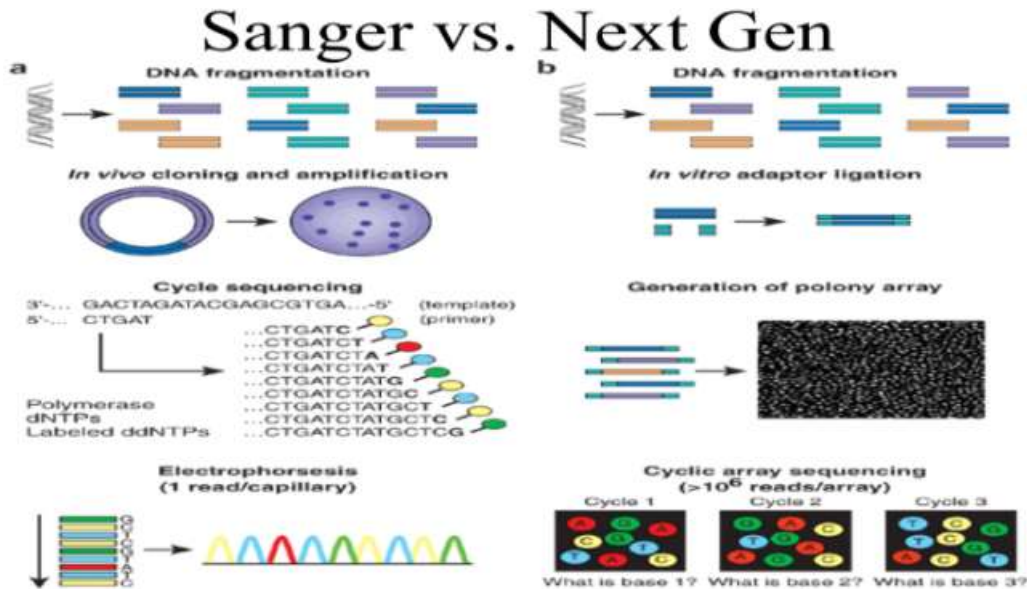
- 항체 검사용 혈청은 감염 후 8-12일 이내의 회복기 돼지의 혈청검체가 좋으며, 용혈된 검

체는 위양성 반응을 나타낼 수 있으므로 판독에 주의해야 함.

■ 차세대염기서열분석(NGS) 기술

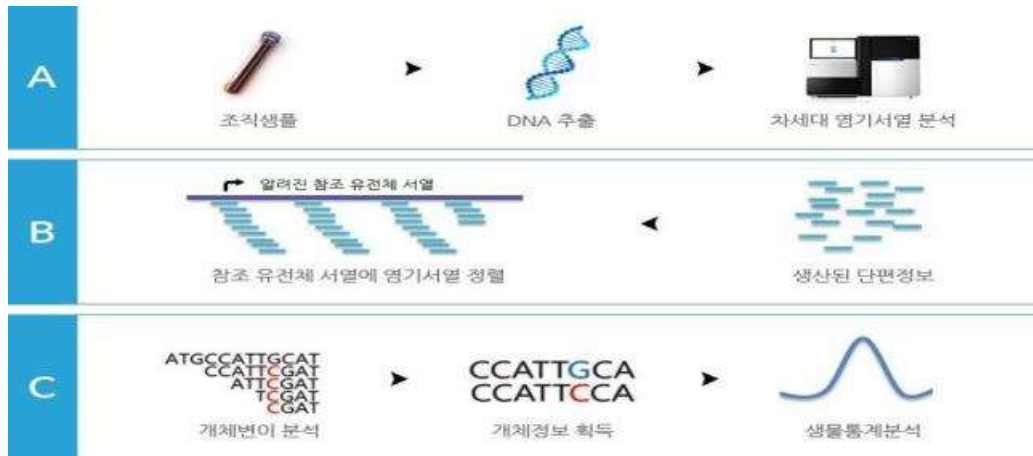
가. 개요

- 차세대염기서열분석법 (Next-generation sequencing; Massive parallel sequencing)은 유전체를 무수히 많은 조각으로 나눈 뒤 각각의 염기서열을 조합하여 유전체를 해독하는 분석 방법으로, 2004년 최초로 상용화된 후 현재까지 그 성능이 비약적으로 발전해왔음.
- Illumina 등 주요 NGS 플랫폼들은 각자 고유한 특성을 지니고 있으며, 플랫폼 및 시약 등의 성능을 경쟁적으로 향상시키고 있음. NGS 기술의 발달과 분석 비용의 하락으로 인해 다양한 연구분야에서 NGS가 보편적으로 활용되고 있으며, 기초 연구 목적 외에도 의료계 및 산업계에서 NGS 기법은 활발하게 사용될 것임.
- 현재 사용되는 NGS분석은 이전의 생거 방식의 자동화 시퀀싱 기기와 구분하기 위해 사용되는 명칭이며, 이전 방식의 자동화 시퀀싱 기기는 기술적인 진보에도 불구하고 개인의 유전체 분석을 위해 막대한 시간과 비용이 요구되었음. 이러한 한계를 극복하고, 유전체를 저렴한 비용으로 분석하기 위해 기존 분석 방법에서 병목이 되는 복잡한 과정을 생략하고, 시간이 많이 소요되는 일련의 과정을 한번에 대량으로 처리할 수 있도록 개발된 것이 NGS분석임.
- NGS분석 기술 발달에 따른 암 등에 대한 유전체 정보의 축적을 통해 암진단, 치료 등에 사용될 수 있는 유전자가 알려지면서, 이를 빠르게 확인 할 수 있는 NGS분석 패널들이 개발되어 사용되고 있으며, NGS분석 패널을 이용한 검사의 임상적 유용성이 유방암, 폐암, 대장암 등에서 밝혀지면서 유전자 진단법은 암을 포함한 검사법으로 대두되고 있음.



<그림 18> Sanger 시퀀싱과 차세대염기서열 분석 비교

- NGS분석은 점점 더 보편화되어 소요되는 비용 또한 해가 갈수록 하락하고 있으며, 향후 NGS분석은 현재 각 실험실에서 생어시퀀싱을 사용하는 만큼이나 빈번하게 사용될 것임.
- NGS를 활용 위해서는 먼저 대규모 염기서열 분석을 연구분야에 효과적으로 접목시킬 수 있을 것인지가 중요하며, 한 번의 NGS분석으로도 상당히 많은 양의 데이터가 생성되기 때문에, 데이터를 어떻게 분석하여 그 중에서 유의미한 결과를 추출해낼 것인지가 중요함.

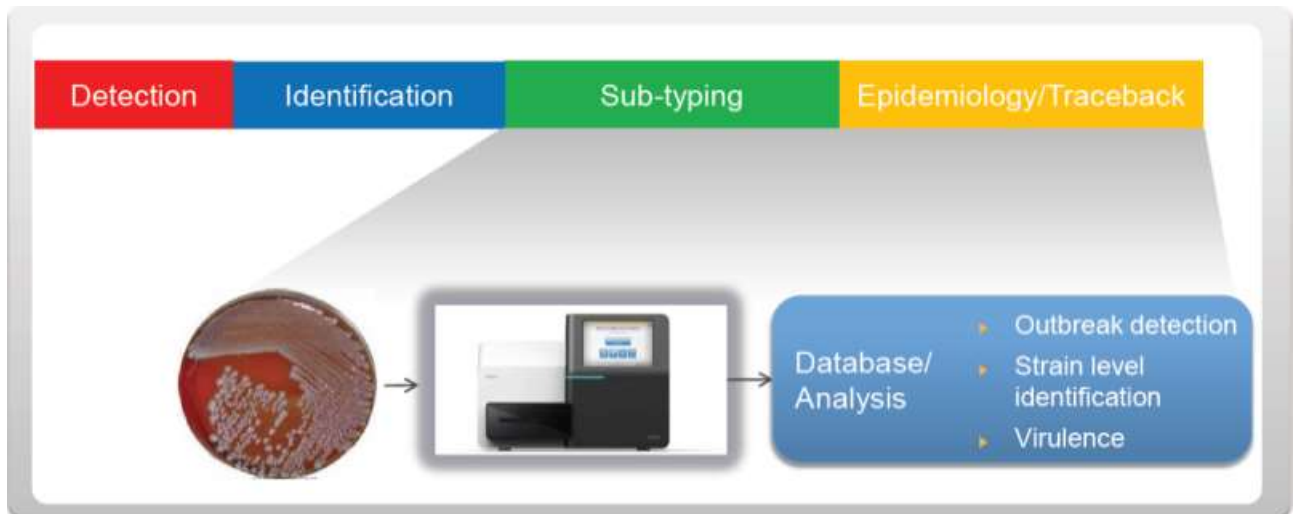


<그림 19> NGS 분석 진행과정

○ NGS 기술은 앞으로도 더욱 빠르게 진화할 것이고, 각 분야에 가장 적절한 플랫폼 및 분석 방법을 개발할 필요함 있음.

나. 감염병과 NGS 기반 진단

- 최근 NGS를 이용해 감염병 진단에 활용하는 사례가 늘고 있음
 - 감염병 감시 및 진단
 - Sub-typing 및 동정
 - 역학 조사를 통한 식품 리콜 조치



1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장현황

■ 기술 현황

- 현재까지 관련 아프리카 돼지열병 바이러스를 검출하는데 PCR 등을 이용하는 분자생물학적 방법이 OIE 가이드라인에 따라 프라이머 등에 대한 정보가 제공되어 있음.
- 아프리카 돼지열병이 국내에 발생하지 않았고, 국내에 아프리카 돼지열병 바이러스를 사용하기 어려운 상황이라 국내에서 효용성 평가가 이루지기 어려움.
- 병원체에 감염된 후 잠복기와 발현기를 거쳐 증상이 급성으로 나타나는 경우가 많아 항원 항체 검사법의 경우 정확한 진단이 어려움.
- 감염초기의 IgM과 IgG 항체 역가가 낮기 때문에 항체가 형성될 때까지 기다린 후 검사가

가능하나 진단이 가능한 시점이 되기 전에 폐사하는 경우가 많으며, 돼지열병 등 다른 질병에 대한 감별진단이 필요함.

○ ASF에 대한 표준검사법(OIE 기준)

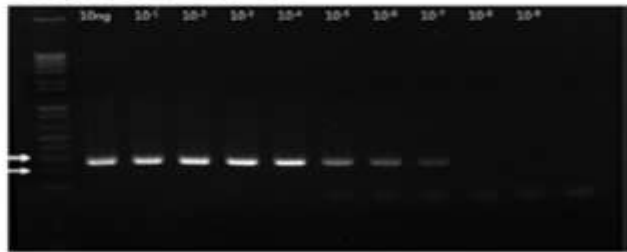
- 농림축산검역본부에서 제시하고 있는 아프리카 돼지열병 표준 진단은 PCR 진단을 바탕으로 한 conventional PCR 과 real-time PCR을 제시하고 있음

PCR primer	
Primer	Sequence
PPA-1	5' AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC 3'
PPA-2	5' CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T3'

onestep RT-PCR :

RT-PCR 증폭 조건			
initial activation	1cycle 95°C 10min		
PCR	denaturation	40cycle	95°C 15sec
	annealing		62°C 30sec
	extension		72°C 30sec
Final extension	1cycle 72°C 7min		

Target band 257 bp



<샘플 DNA(10ng/μl)를 10⁰ ~10⁷까지 희석하여 PCR 실시 후 전기영동 결과>

<그림 20> 아프리카 돼지열병 바이러스의 PCR을 통한 유전자 진단 검사 방법 및 결과

- 하지만 PCR 및 real-time PCR은 검체 배양에서 검사까지 시간이 소요되며, 실험실적 장비가 필요해 현장검사용으로는 적합하지 않음

○ 차세대염기서열(NGS)분석 기술 적용

- 현재 상용화 되어 있는 NGS 분석 장비의 기본적인 원리는 서로 비슷하며, 최초로 상용화된 NGS 플랫폼인 ‘454’ 가 2004년 출시된 후로 현재까지 다양한 NGS 분석플랫폼이 출시되고 또한 진화하여 왔으면 국내에서 도입되어 활용되고 있음.
- 국내에서도 세계적 추세와 비슷하게 Illumina의 플랫폼을 가장 많이 사용하고 있고 있으며, High Performance급 장비로는 Illumina의 플랫폼 (HiSeq, Genome Analyzer 2X)이 전체의 70.7%를 차지하는 것으로 나타났었고, Benchtop급 장비는 Thermo Fisher (Life Technologies) 사의 Ion Torrent가 45.1%를 차지하고 있으며, Illumina의 MiSeq이 35.3%이었음.

<표 3> 주요 NGS 회사의 플랫폼 변화

구분	2010	2011	2012	2013	2014	2017
Illumina	HiSeq 2000 출시 SOLID 5500w 및 5500 xjw 출시	MiSeq 출시	HiSeq 2500 출시	MiSeqDx, 미 FDA 진단장비 승인 획득	NextSeq 500, HiSeq X Ten 출시	NovaSeq 시리즈 출시
Thermo Fisher (Life Technologies)	Ion Proton, Personal Genome Machine(PGM) 출시 Life Technologies, Ion Torrent인수		Ion Proton 출시		Thermo Fisher, Life Technologies 인수	
Roche	GS Junior 출시		Roche, Illumina 인수 시도 실패	454 개발 중지 발표	Roche, Genia 인수	
PacBio		PacBio RS 출시		PacBio RS II 출시		
Oxford Nanopore			MinION, GridION 출시		PromethION 발표	

■ 시장현황

- 아프리카 돼지열병의 국내 발생이나 해외에서 유입된 사례가 없기 때문에 국내 시장은 현재 미비한 상태이며, 일부 국가기관에서 모니터링에 사용한 경우가 있음.
- 국내에 아프리카 돼지열병이 유입될 가능성이 높아서 발생할 경우, 국내에 아프리카 돼지열병 진단키트 사용이 급격히 늘어나 가능성이 높음.

■ 경쟁기관 현황

- 국내 업체에서 자체 개발한 아프리카 진단키트는 한가지 제품이 허가되어 국내에 공급하고 있는 상태임.
- 국내 기업인 (주) 메디안디노스틱이 ASFV에 대한 real-time PCR을 기본으로 하는 분자진단키트인 ASFV 실시간 유전자 진단키트 (제품명: VDx® ASFV qPCR)을 개발하여 검역본부로부터 품목허가를 받았음.
- 또한 ASFV 항원을 검출하는 형광간이신속진단키트(제품명:VDRF® ASFV Ag Rapid Kit)를 개발하여 베트남에서 170개 이상의 양성 혈액시료를 사용하여 유용성을 평가하였을 때, 민감도 약 80%를 나타내었음.
- 아프리카 돼지열병에 대한 양성패널 부재로 인하여 개발이 제한되어 있음.

■ 지식 재산권 현황

- 국내에 아프리카 돼지열병 관련 지식재산권은 3건이며 아프리카 돼지열병의 바이러스 단백질 관련해서 2건이 농림축산검역본부에서 출원등록하였음.
- 아프리카 돼지열병의 약독화 바이러스 균주 및 저해제 관련하여 2건이 출원되었으나 공개된 상태임.
- 아프리카 돼지열병에 대한 분자진단법에 대하여 1건이 출원된 상태임.

<표 4> 지식재산권 현황

발명 명칭	출원인	상태
아프리카 돼지열병 바이러스 단백질 K205R에 대한 단클론항체 및 이를 포함하는 아프리카 돼지열병 바이러스 진단용 조성물	농림축산검역본부	등록 (2016)
아프리카 돼지콜레라 바이러스의 p12 유전자를 함유한 유전자 재조합 배큐로바이러스 및 항체검출용 p12단백질	농림축산검역본부	등록 (2003)
아프리카 돼지 열병바이러스 유래 p72 단백질 절편 및 이의 용도	연세대학교 원주산학협력단	출원 (2020)
아프리카 돼지 열병 바이러스 유래 p205 단백질 절편 및 이의 용도	연세대학교 원주산학협력단	출원 (2020)
아프리카 돼지 열병 바이러스 유래 p104 단백질 절편 및 이의 용도	연세대학교 원주산학협력단	출원 (2020)
모 바이러스 조지아 2007 분리주의 감염에 대한 합리적으로 개발된 아프리카 돼지 열병 약독화 바이러스 균주	유나이티드 스테이츠 오브 아메리카 등	출원 (2017)

■ 표준화 현황

- 국가방역기관인 농림축산검역본부에서 국내에 아프리카 돼지열병이 유입될 것에 대하여 대비하여 OIE 기준을 따라 가이드라인을 제시하였음.

- OIE 가이드라인이 진단용 항원 또는 유전자에 대한 프라이머 서열을 제시하여 실제 키트를 이용한 표준화 가이드라인은 제시되어 있지 않음.

■ 기타 현황

- 현재 국내에 아프리카 돼지열병이 발병하지 않아 시급성을 고려하여 외국의 자료를 인정하여 외국제품을 허가하였으나, 실제 국내에 발생할 시에 대한 유용성이 확인되지 않았음.
- 현재 등록된 아프리카 돼지열병 진단키트는 외국에서 수입된 고가의 제품으로 대량으로 사용시 국가자본이 외국에 대량 유출될 수 있음

나. 국외 기술 수준 및 시장현황

■ 기술 현황

- 국내와 마찬가지로 아프리카 돼지열병에 대한 혈청검사와 PCR 진단법이 있으며 아프리카 돼지열병이 발생했던 국가 중에서 스페인과 프랑스에서 아프리카 돼지열병에 대한 혈청이나 혈장 또는 조직액을 이용한 ELISA 검사키트가 개발되어 제품으로 생산되고 있음.
 - 신속검사키트(ICA)를 이용한 아프리카 돼지열병 키트는 아직 상용화 되어 있지 않음.
 - 아프리카 돼지열병에 대한 PCR 테스트는 개발이 용이하여 여러 선진국에서 개발되어 상용화 되어 있음.
 - 아프리카 돼지열병이 발생하여 러시아의 국가기관에서는 자체 IFA를 개발하여 사용하고 있음.
 - 아프리카 돼지열병에 대한 항체를 개발하여 항원신속검사키트의 개발하여 현장에서 적용할 필요가 있음.
- NGS 분석플랫폼이 지속적으로 발전하여 왔으며, 이 중 가장 널리 사용되는 것은 Illumina사의 플랫폼으로, GenBank에 등록된 염기서열의 90%가량이 Illumina의 플랫폼으로 생성된 데이터일 정도로 NGS 분야에서 광범위하게 사용되고 있음. HTStec에서 발표한 보고서에 따르면, Illumina의 HiSeq2000/1000을 사용한다고 답변한 응답자가 전체의 39%로 가장 높은 비율을 차지했으며, 그 외에도 Roche의 454 GS FLX+ (35%), Illumina MiSeq (31%), Thermo Fisher사의 Ion Torrent PGM (28%), Illumina Genome Analyser Ix (26%), Illumina HiSeq 2500/1500 (20%), Life Technology 사의 ABI SOLiD 2000 (12%), Roche 454 GS Junior (12%) 등이 사용되고 있음.

<표 5> Illumina 플랫폼과 사양 비교

	HiSeq X Ten	HiSeq 2500				NextSeq 500		MiSeq
		Hiseq v4	Truseq v3	Rapid v2	Rapid	High-output	Mid-output	v3
Read Length (bp)	2x150	2x125	2x100	2x250	2x150	2x150	2x150	2x300
Run Time	3일	6일	11일	60시간	40시간	29시간	26시간	~65시간
Total Output	1.8 Tb	1 Tb	~600 Gb	~300 Gb	~110 Gb	~100 Gb	~36 Gb	~ 5.5 Gb
단일 read 갯수	60억	40억	30억	12억	6억	4억	1.3억	2천5백만
Quality Score	> 75% above Q30	> 80% above Q30	> 80% above Q30	> 75% above Q30	> 75% above Q30	> 75% above Q30	> 75% above Q30	> 70% above Q30

○ NextSeq500 - 하이브리드형 NGS 플랫폼

- NextSeq500은 기존의 Illumina 플랫폼인 HiSeq과 MiSeq의 장점인, high-throughput의 성능을 가지면서 소규모 실험실에서도 사용 가능한 desktop sequencer의 기능을 수행하는 것을 목표로 제작되었으며, 가장 큰 장점은 한 대의 기계로 High-Output과 Mid-Output라는 두 종류의 키트를 번갈아 사용할 수 있음. High-Output Kit는 약 하루 정도의 run time으로 최대 400M의 read를 갖는데, 인간 유전체 하나를 30x coverage로 분석할 수 있으며, 9종의 Exome과 10종의 Transcriptome 분석이 가능하다. Mid-Output Kit는 최대 130M read로 3종의 exome, 6종의 enrichment panel과 96개의 amplicon panel을 분석할 수 있음. 용도에 따라 whole-genome sequencing과 de novo assembly부터 소규모의 타겟 유전자분석까지 하나의 장비로 해결할 수 있음.

○ HiSeq X Ten : 대규모 분석을 위한 플랫폼

- HiSeq X Ten은 human 전장유전체의 대규모 분석을 위해 특수하게 제작된 플랫폼으로, 이 장비는 3일간의 작동으로 약 1.8 테라바이트(TB) 분량의 유전체 데이터를 해독할 수 있는데, 이는 약 16명의 인간 전장 유전체에 해당하는 양임. HiSeq X Ten 을 이용하면 연간 18000명 가량의 전장 유전체를 30x coverage로 분석할 수 있으며, HiSeq X Ten은 현재 인간의 전장 유전체분석만 가능하며, 국내에서도 도입되어 있음. HiSeq X Ten의 상용화로 인해 현재 4천달러 수준인 인간 유전체 분석 비용을 천 달러 이하로 떨어뜨릴 수 있으리라 기대하고 있으며, 인간 유전체 연구 역시 가속도가 붙을 전망이다

■ 진단장비로서의 NGS 플랫폼

○ 유전체 검사를 통한 임상 의학에 사용될 NGS 플랫폼 경쟁에서도 역시 Illumina는 선두를 달리고 있으며, 미국 FDA는 Illumina의 MiSeqDx 플랫폼을 NGS를 이용한 최초의 진단장비로 승인하였으며, 승인을 받은 장비는 MiSeqDx와 Universal Kit reagents, 그리고 낭성섬유증(Cystic fibrosis)을 진단하는 두 가지 실험 기법인 “MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay” 와 “MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay” 임

○ Thermo Fisher (Life Technologies)사도 Ion PGM Dx System을 미국 FDA의 Class II 의학 장비로 승인받았음.

■ 유전체 데이터보관과 처리법

○ NGS를 이용한 유전체분석에서 분석 과정에서 생성되는 대용량의 유전체데이터를 효율적으로 저장하는 방법이 중요하며, 미국의 Broad Institute나 중국의 BGI 등의 대규모 유전체 연구소에서 하루에 생성되는 데이터의 양은 수 백 테라바이트 급에 달하며, 최근 미국립암센터(National Cancer Institute)는 암 유전체 정보를 클라우드에 복사하는데 약 2,000만 달러를 지불함.

○ NGS 기술 발달과 더불어 유전체데이터를 클라우드에 저장하여 분석하는 서비스를 제공하기 시작하였으며, DNANexus, Globus Genomics, Tute Genomics, Seven Bridges, NextCode 등이며, 국내 기업에서도 GenomeCloud를 선보이고, 서비스를 제공하고 있음. 대부분의 서비스에서 클라우드 저장 용량 및 클러스터 컴퓨팅, 간단한 분석 도구 등을 사용하여 분석하는 기능을 제공하고 있음.

■ NGS를 이용한 최신 연구동향

○ Resequencing: Resequencing은 이미 레퍼런스 유전체가 완성된 생물종의 다양한 유전체를 분석하고 그 서열을 레퍼런스와 비교함으로써 특정 유전체 내 SNP, splicing variant 등의 변이를 발굴하고자 할 때 주로 사용되는 기법으로 질병 유전자 등 유전체의 특정 부위만을

분석하여 비교하는 Targeted resequencing도 이에 포함되며, NGS가 가장 널리 활용되고 있는 분야이임. 엑솜 시퀀싱, 유전자를 이용한 진단 검사 의학, Genome-wide association studies (GWAS) 등으로 응용되고 있음.

○ Whole exome sequencing (WES)

- 단백질을 코딩하고 있는 부분을 총망라하는 개념인 엑솜 (Exome)은 전체 인간 유전체의 2% 정도 밖에 되지 않지만, 현재까지 알려진 질병 관련 유전자들의 85% 가량이 엑솜에 위치한다고 알려져 있어, 질병 관련 유전자 발굴 및 진단 검사에는 빠르고 효율적이면서 저비용의 분석이 가능한 엑솜 시퀀싱을 주로 활용하고 있음.

○ 분자진단검사 및 임상의학

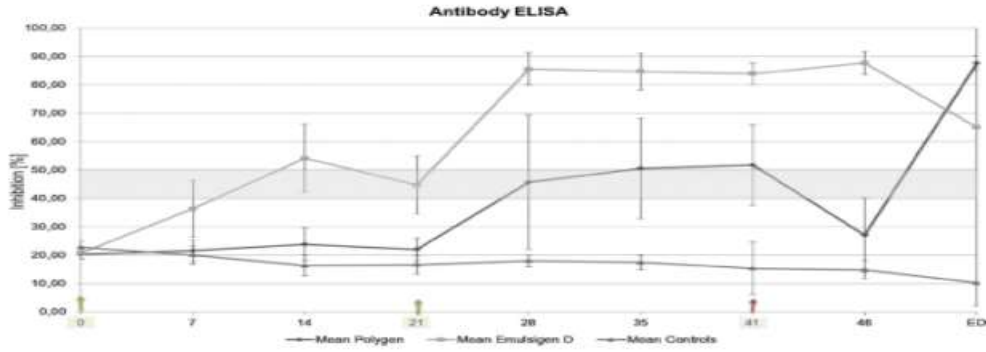
- 생어 시퀀싱법으로는 분석 시간 및 비용의 문제로 특정 질환에 특이적인 소수의 유전자 검사만이 수행되었고 따라서 정확도가 낮았지만, NGS의 발전으로 인하여 하나의 샘플에서 다양한 질병 관련 유전자들을 동시에 분석할 수 있으므로, 유전체 분석을 통한 검사 및 분자진단이 본격적으로 활용되고 있음.
- 다양한 암 관련 유전자들을 분석하는 패널을 AstraZeneca, Janssen Biotech, Inc., Sanofi 등의 제약회사들과 공동으로 개발하여, 이를 활용한 assay들이 개발되고 진단장비로 승인을 받아 활용될 것임.

○ GWAS (Genome-Wide Association Study)

- GWAS란 각 개체의 유전체를 해독하여 비교, 분석함으로써 특정 질병과 연관된 유전적 요인을 찾는 연구방법이며, 1000 Genomes, HapMap Project 등을 통하여 구축된 dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)에 정보가 등록되어 있어, 이러한 정보를 바탕으로 특정 질환을 앓고 있는 환자와 그렇지 않은 사람의 유전체를 해독하고 SNP의 차이를 분석하여 환자 집단에서 차이를 보이는 SNP와 그에 해당하는 유전자를 추려냄으로써 질환과

■ 기술현황(백신)

- 아프리카 돼지열병에 대한 백신을 개발하기 위하여 지난 30여년간 다양한 백신개발 시도를 하였음.
 - ◆ 아프리카 돼지열병 바이러스 불활화 백신
 - 기존의 다른 바이러스질병과 같이 바이러스를 불활화하여 접종하였을 때, 항체반응은 유도되었지만, 예방효과는 전혀 없었음.
 - ◆ 아프리카 돼지열병 바이러스 재조합 단백질 백신
 - 재조합 단백질 백신의 안전성에서 문제가 전혀 없으며, 아프리카 돼지열병에 감염된 경우에 대한 감별진단법(DIVA)의 개발이 가능함
 - 아프리카 돼지열병에 대한 재조합 단백질을 개발하기 위하여 방어효과를 나타내는 항원을 선별할 필요가 있음
 - 재조합 단백질의 경우 기존의 oil-immersion을 사용하였을 경우, 항체나 중화항체가 형성되나 효과가 미미하였음.
 - 적합한 항원을 발굴·선별 및 기존의 면역보조제가 세포면역을 유도할 수 있는 새로운 면역보조제의 개발이 필요함



<그림 21> ASF 불활화 백신에 대한 면역보조제의 영향

◆ 아프리카돼지열병 바이러스에 대한 DNA 백신

- DNA 백신은 안전성이 높으며, DNA 백신 자체에 면역증강 작용을 하여 항체 및 세포면역을 유도함
- 아프리카 돼지열병에 대하여 DNA 백신을 시도하였을 때, 항체 및 세포면역을 유도하였음.
- 기존의 DNA 백신용 plasmid vector를 사용하였을 때, 항체 면역은 잘 유도하였지만, 세포면역이 약하게 유도되어, 세포면역을 강력하게 유도할 수 있는 DNA 백신 plasmid vector를 개발이 필요함.

<표 6> ASF 단백질 및 DNA 백신 개발 현황

Genes/proteins delivered	Type of vaccine	Challenge
p54/E183L, p30/CP204L	Baculovirus expressed proteins	Partial protection
P54/E183L, p30/CP204L, p72/B646L	Baculovirus expressed proteins	No protection
CD2v/pEP402R	Baculovirus expressed proteins	Partial protection
p54/E183L, p30/CP204L	DNA vaccination	No protection
Ubiquitin-CD2v/pEP402R-	DNA vaccination	Partial protection
p54/E183L-p30/CP204L	DNA vaccination	Partial protection
DNA expression library	DNA vaccination	Partial protection

◆ 아프리카돼지열병 바이러스 약독화바이러스 백신

- ASFV의 유전자 중 병원성을 나타내는 유전자를 제거하여 안전성을 높이는 전략임.
- Live ASFV으로 야생형 바이러스와 가장 유사하므로 예방백신 효과가 높은 편임
- 병원성 유전자 한 개에서 몇 개의 유전자를 제거하였기 때문에 예방효과가 높더라고 안전성이 문제가 될 수 있음.
- 아프리카 돼지열병 바이러스가 발생하지 않은 우리나라에서는 적용이 어렵고, 이후 발생을 고려하여 개발을 준비할 필요는 있음.

<표 7> 개발 중인 ASF 약독화 백신 현황

Parental ASFV	Vaccine type	ASFV vaccine	Cell production system	PROTECTION
NH/P68 (att)	Naturally attenuated	NHV/P68	PBM	Heterologous strain (L60, ARM07)
OURT88/3 (att)	Naturally attenuated	OURT88/3	BM	Homologous/heterologous strain (OURT88/1, UG65)
Georgia07 (vir)	Genetically modified	Georgia07Δ9GL&DP96R/UK	PAM	Homologous strain
Ba71 (vir)	Genetically modified	Ba71ΔCD2/EP402R	COS	Homologous and heterologous strain (E75, GEORGIA07)
Benin (vir)	Genetically modified	BeninΔMGF	BM	Homologous strain
Benin (vir)	Genetically modified	BeninΔDP148R	BM	Homologous strain
NH/P68 (att)	Genetically modified	NH/P68ΔA238L	COS + 4 passages in PAM	Homologous and heterologous strain (ARM07)

■ 시장 현황

- 국외의 경우 러시아를 포함한 서유럽 국가들에서 지속적으로 발생하는 상황이어서 아프리카 돼지열병 진단키트를 사용되고 있음
- 러시아의 국립수의연구소에서는 자체개발한 IFA를 사용하지만, 표준적인 검사를 위하여 ID-Vet 사의 ELISA를 사용하여 검사하는 상황임
- 최근 중국, 베트남, 몽골에서 아프리카 돼지열병이 발병하여, 아시아 지역 국가에서 해외여행객들 및 교류로 인하여 유입되었을 가능성이 높은 상황임.
- 이로 인하여 중국을 포함한 아시아지역에서 아프리카 돼지열병 진단 키트에 대한 수요가 증가할 것으로 예상되어짐.

■ 경쟁기관현황

- 국외의 진단시장은 상용화된 ELISA를 이용한 진단키트를 사용하는 곳이 대부분이며, Real-time PCR 등 아프리카 돼지열병 항원검출진단키트를 이용하여 감별진단에 사용하는 제품들이 있음.
- 아프리카 돼지열병에 대한 민감도나 특이도에 있어서 특이도는 높지만, 감염된 돼지가 급성으로 폐사하는 경우에는 항체가 생성될 시간이 부족하여 아프리카 돼지열병에 대한 ELISA 진단 키트의 경우 민감도가 항원검출에 비하여 민감도가 낮은 편임.
- 현재 항체를 검출하는 상용화된 아프리카 돼지열병 키트는 4개 회사 제품이 있으며, 바이러스 항원을 검출하는 상용화된 키트는 항원검출 ELISA 키트 1개제품과 PCR제품이 있음.

■ 지식재산권 현황

- 아프리카 돼지열병에 대한 지식재산권은 전체 4,892건이 있는 것으로 조사되고, 이 중 미국이 4,892건으로 전체의 약 50%를 차지하고 있음. 아프리카돼지열병이 발생하고 있는 유럽에는 1,086건이 있으며, 중국 54건, 일본 94건이 있음. 이중 PCT 건은 2,559건이 조사되었음.
- 아프리카 돼지열병에 대한 ELISA를 이용한 지식재산권은 전체 5,559건이며, 이도 마찬가지로 미국이 3,140건이며, 유럽이 706건, PCT가 1,665건임. 반면에 아시아인 일본에서 40건, 중국에서 8건이 특허건이 검색되었음.
- 아프리카 돼지열병에 대한 분자생물학적인 검출방법에 대한 특허도 미국이 절반을 차지하고 다른 검사법과 비슷한 패턴을 보였음.

■ 표준화 현황

- 아프리카 돼지열병에 대한 표준검사법으로 정해진 것은 없으며, OIE가 권장하는 가이드라인에 따라 진단하거나 그 유용성이 인정된 제품을 이용하여 진단하는 것으로 되어 있음.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

■ 차세대염기서열분석법(Next generation sequencing, NGS)을 이용한 아프리카돼지열병바이러스(African Swine Fever Virus, ASFV) 유전체빅데이터 생산 및 분석기술 개발



<그림> NGS를 이용한 ASFV 유전체빅데이터 생산 및 분석기술 개발의 개념도

- 본 연구과제에서 아프리카돼지열병 발생을 감시하고 신속대응하기 위하여 차세대염기서열 분석법을 활용한 유전체 빅데이터 생산 및 분석기술을 개발하는 연구를 수행하였음
- 아프리카돼지열병 감염 현장에서 획득한 검체를 즉시 역학조사에 활용함으로써 현장통제, 신속진단, 격리조치 등이 가능
- 아프리카돼지열병 감염 동물 간의 유전자 정보 비교를 통해 아프리카돼지열병 바이러스의 전파/유입 경로/시기 등의 확인이 가능
- 본 연구개발을 통해 세계 어느 국가보다도 빠르게 아프리카돼지열병 발생을 과학적 근거를 바탕으로 정밀하게 감시하고 신속하게 대응 가능

1) 기존 Shot-gun 방식을 이용한 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 유전체 빅데이터 생산 및 분석 기술 개발

○ NGS 라이브러리 제작

- 아프리카돼지열병바이러스에 대한 캡처프로브와 Whole genome sequencing을 위해 Ion Xpress Plus Fragment Library kit를 이용해 라이브러리를 제작함.

Step 1. DNA Fragmentation

-Choose one of two options below

<Option 1> DNA fragmentation using sonication

1. Ensure the appropriate quality and quantity of gDNA. Make sure the DNA integrity number (DIN) value of gDNA is higher than 6.5
2. Fragment the gDNA into 100–500bp fragments so that the main peak of the gDNA is 150–200bp.

<Option 2> DNA fragmentation using enzyme

- : Adjust the enzyme treatment time to fragment the gDNA into 100–500bp fragments so that the main peak of the gDNA is 150–200bp

Step 2. Purification of the DNA Sample Using Clean-up Beads

Reagent	Volume Ratio (Beads : Sample)
CeleMag Clean-up Beads	1.8 : 1 (180µl : 100µl)

*NGS Library Preparation

Step 1. End-repair

Reagent	Volume (µl)
Fragmented DNA	X (up to 51)
End Repair Reaction buffer	6
End Repair Enzyme Mix	3
Nuclease-free water	51-X
Total	60

Step	Temperature	Time
1	25°C	20mins
2	70°C	10min
3	4°C	Hold

(Lid Temperature: 80°C)

Step 2. Adapter Ligation

Reagent	Volume (µl)
End repaired Sample	60
Barcode Adapter	10
P1 Adapter	10
T4 DNA Ligase	6
T4 DNA Ligase Buffer for IonTorrent	10
Bst DNA Polymerase	1
dNTP Mixture	3
Total Volume	100

Step	Temperature	Time
1	25°C	15mins
2	65°C	5min
3	4°C	Hold

(Lid Temperature: 75°C)

Step 3. Purification of sample Using CeleMag Clean-up Beads

CeleMag Clean-up Beads (X)	Elution (Y)
180 μ l	27 μ l

Step 4. Double sided size selection

1. Add 75 μ l Nuclease-free water to Adapter-ligated DNA 25 μ l (total 100 μ l)
2. Add 90 μ l CeleMag Clean-up Beads, Incubate at RT for 5mins
3. Place the tube in the magnetic separator for 5mins
4. Transfer the supernatant (~190 μ l) to new 1.5ml LoBind tube

CeleMag Clean-up Beads (X)	Elution (Y)
20 μ l	22 μ l

Step 5. Amplification of the Adapter-Ligated Library

Reagent	Volume (μ l)
Adapter-ligated DNA Library	20
CLM Polymerase	25
Library Amplification Forward Primer	2.5
Library Amplification Reverse Primer	2.5
Total volume	50

Step	Temperature	Time
1	98 $^{\circ}$ C	45 secs
2 (Total 15 cycles)	98 $^{\circ}$ C	15 secs
	60 $^{\circ}$ C	30 secs
	72 $^{\circ}$ C	1 min
3	72 $^{\circ}$ C	10 mins
4	4 $^{\circ}$ C	Hold

Step 6. Purification of sample Using CeleMag Clean-up Beads

CeleMag Clean-up Beads (X)	Elution (Y)
50 μ l	32 μ l

***Hybridization and Washing**

Step 1. Enhanced Hybridization of the Library

- 1) Block mix with DNA library

Reagent	Volume (μ l)
Nuclease-free water	3.4
Block #1	2.5
Block #2	2.5
Block #3 (D)	0.6
Total volume	9

1. Add 9 μ l of block mixture in the tube (with completely dried sample)
2. Resuspend the dried amplified DNA library

Step	Temperature	Time
1	95 $^{\circ}$ C	5mins
2	65 $^{\circ}$ C	Hold

2) Hybridization buffer Mix

Reagent	Volume (μ l)
Hyb Buffer	24
Hyb Buffer Enhancer	3
Total volume	27

Step	Temperature	Time
1	65°C	3mins
2	65°C	Hold

3) Capture Library Mix

Reagent	Volume (μ l)
Target Capture Probe #1 (TC#1)	6
Target Capture Probe #2	1
Total volume	7

Step	Temperature	Time
1	65°C	2mins
2	65°C	Hold

-1st Column: Block Mix (+DNA)

-2nd Column: Hyb Buffer Mix

-3rd Column: Capture Library Mix

1. Transfer 18 μ l of 2nd Column to 3rd Column

2. Transfer 7 μ l of 1st Column to 3rd Column

Step	Temperature	Time
1	65°C	>16hr

Step 2. Preparation of CeleMag Streptavidin Beads

1. Add 50 μ l CeleMag Streptavidin Beads
2. Add 200 μ l of Wash Buffer #1
3. Remove Wash Buffer #1 on Magnetic stand
4. Repeat step 2-3 for twice(Total 2 times)
5. Add 200 μ l of Wash Buffer #1

Step 3. Selection of the Target Captured Library

1. Add 32 μ l Hyb mixture to washed beads
2. Incubate 30 mins on rotator and remove buffer
3. Add 500 μ l of Wash Buffer #2
4. Incubate 15mins and remove buffer
5. Add 500 μ l of Wash Buffer #3
6. Incubate 10mins on 70°C heat block
7. Put the tube in the magnetic separator and remove buffer
8. Repeat Steps 5-6 for 3 times
9. Add 20 μ l of DW

***Amplification of Target Captured Library**

Step 1. Amplification of the Captured Library

Reagent	Volume (µl)
On-beads captured library	20
CLM Polymerase	25
Nuclease-free water	5
Library Amplification Forward Primer	2.5
Library Amplification Reverse Primer	2.5
Total volume	50

Step	Temperature	Time
1	98 °C	45 secs
2 (Total 16 cycles)	98 °C	15 secs
	60 °C	30 secs
	72 °C	1 min
3	72 °C	10 mins
4	4 °C	Hold

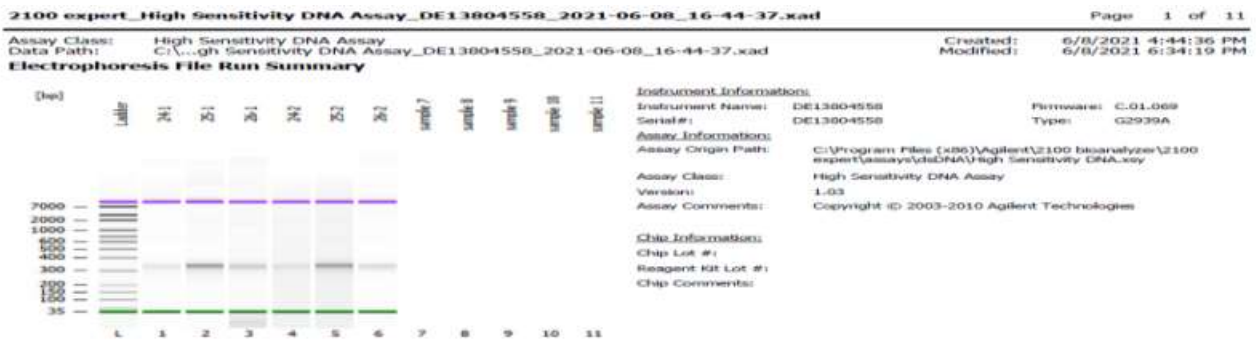
Step 2. Purification of sample Using CeleMag Clean-up Beads

CeleMag Clean-up Beads (X)	Elution (Y)
90 µl	32 µl

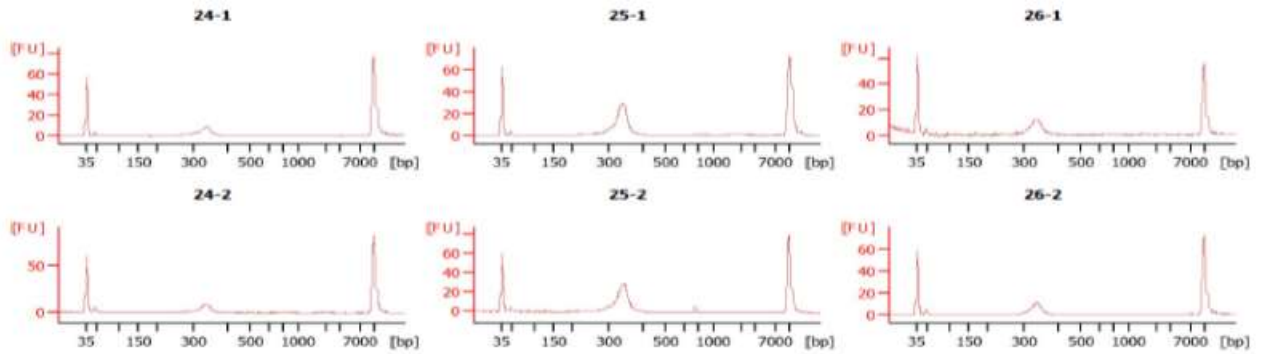
Step 3. Library QC and Quantitation

Qubit/qPCR : Measure the concentration of the captured library

Bioanalyzer/TapeStation : Measure the average fragment length of the captured library



- Covaris M220 장비로 gDNA shearing하고 End repair 진행 후 Barcode Adapter를 ligation하고 E-Gel 장비로 라이브러리 크기를 선별하여 증폭하고 Bioanalyzer를 이용해 라이브러리 QC를 진행함 (200 bp read 기준 330 bp 크기)



<Bioanalyzer 결과>

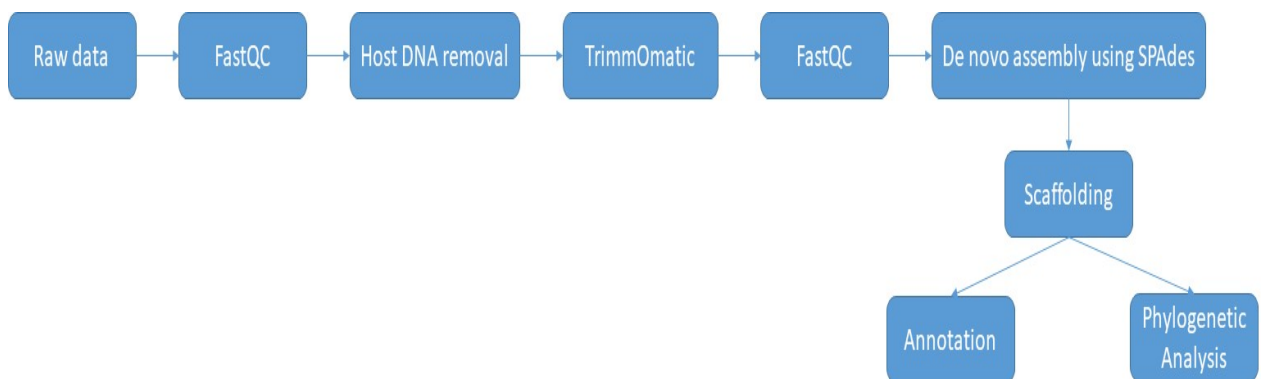
○ Ion Chef 및 Ion S5XL 장비 구동

- 제작한 라이브러리를 Ion 530 chip을 사용하여 분석함.
- Ion chef 장비에 Ion 530 kit를 장착하여 12-13시간 반응 후 다음날 S5 장비로 옮겨서 sequencing을 진행함.

■ 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 유전체 시퀀스 분석 결과

○ IonTorrent S5를 이용한 ASFV 유전체 분석

1) 데이터 분석과정



<그림> ASFV 유전체 분석 과정

- Host DNA 시퀀스를 제거하기 위하여 bowtie2를 이용하였음
- BLAST의 distance tree 기능을 이용하여 phylogenetic analysis를 실시함

2) 시퀀싱 데이터 information

<표> ASFV 유전체 분석결과

#	ID	Reads(before QC)	Reads(after QC)	Contigs	N50	Library
1	S5XL-0368-14-AFSV_1.IonXpress_001	5,353,542	4,662,749	217		
2	S5XL-0368-14-AFSV_1.IonXpress_003	5,464,713	Not Passed			

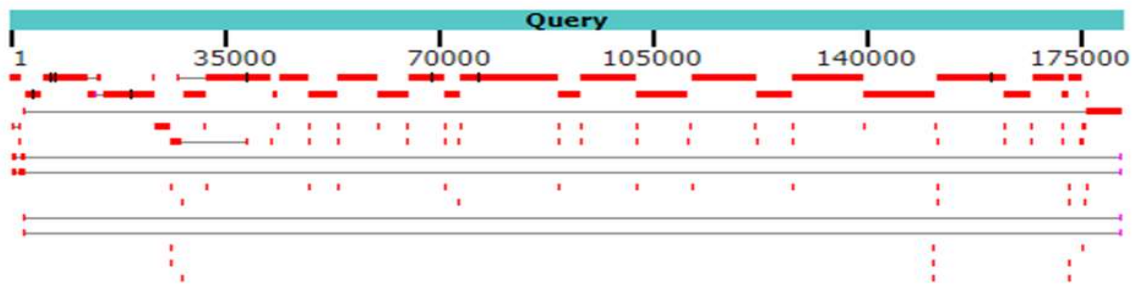
- 시퀀싱 데이터 2개를 사용하여 데이터 정보를 분석하였음

- S5XL-0368-14-AFSV_1의 reads 수는 약 5,353,000 리드수가 나왔고, 217개의 contigs를 생성하였음
- S5XL-0368-14-AFSV_3의 reads 수는 약 5,464,000 리드수가 나왔으나 QC를 통과하지 못하여 contigs가 생성되지 못하였음

3) de novo Assembly 결과

3.1 5XL-0368-14-AFSV_1.lonXpress_001

Distribution of the top 136 Blast Hits on 100 subject sequences



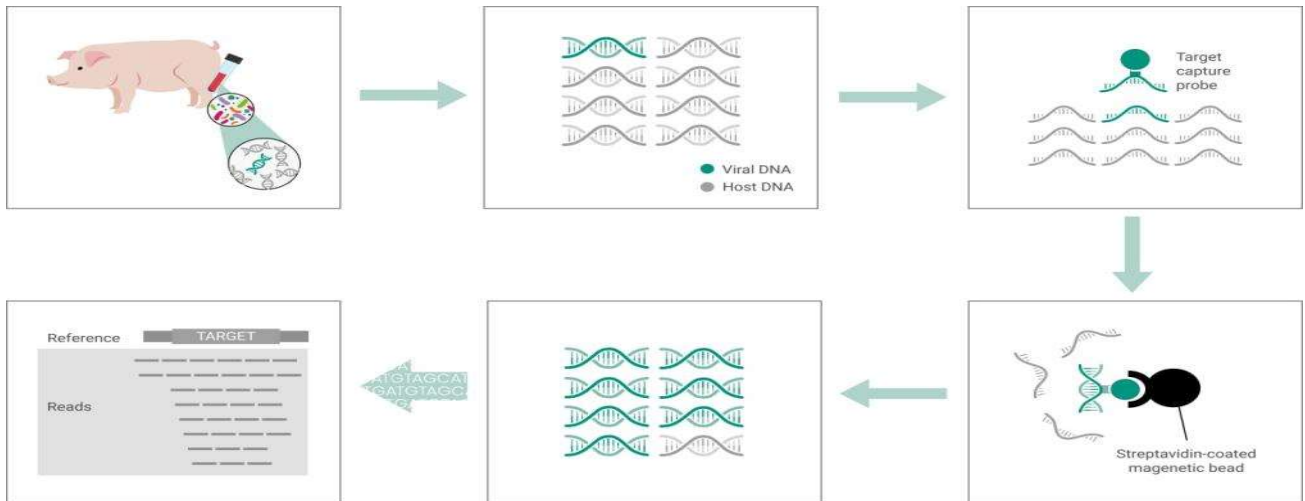
<그림> S5XL-0368-14-AFSV_1.lonXpress_001의 BLASTN 결과

- Query: African swine fever virus strain Nu1986 (GenBank Accession, MW723482.1)
- Subject: S5XL-0368-14-AFSV_1.lonXpress_001 (217 Contigs)
- 추가적인 Scaffolding 이 필요

- ASFV에 대한 shot-gun 방식을 이용한 전장유전체시퀀싱에서 2개의 시퀀싱 중 1개에서만 시퀀싱이 되었음.
- 이는 ASFV를 배양하는 데 사용된 세포주의 DNA가 많이 혼입되어 바이러스 DNA 시퀀싱의 비율이 낮아 기인하는 것으로 추정됨

2) ASFV 특이 Capture probe 방식(셀레믹스)을 이용한 아프리카돼지열병바이러스 (ASFV) 유전체 빅데이터 생산 및 분석 기술 개발

- ASFV의 경우 DNA 바이러스로서 숙주세포의 DNA에 의한 시퀀싱 간섭을 벗어나기 어려운 편임
- ASFV 특정 시퀀스만 시퀀싱하기 위하여 ASFV에 대한 probe 방식을 이용하여 시퀀싱을 시도 함
- IonTorrent를 이용한 아프리카돼지열병 바이러스 검출 방법 개발
 - 아프리카돼지열병 바이러스를 IonTorrent(Thermo Fisher) S5 플랫폼을 이용해 시퀀싱하기 위하여 기존에 제작된 아프리카돼지열병 **바이러스 패널**을 사용하였음
 - 기존 패널은 ASFV 26개 종을 사용하여 제작되었으며, Target size는 192kb임

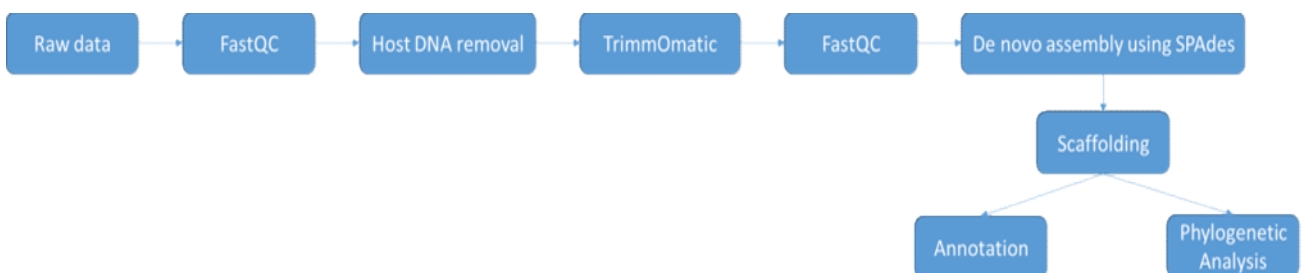


<그림> 아프리카돼지열병 바이러스 패널을 이용한 바이러스 DNA 검출 및 시퀀싱 과정

- IonTorrent S5 플랫폼을 이용해 4개의 샘플을 2개의 라이브러리로 제작하여 총 4개의 시퀀싱 데이터를 생산하였음

#	ID	Reads(before QC)	Reads(after QC)
1	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001	2,715,601	2,412,110
2	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002	2,793,805	2,475,815
3	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_003	2,741,046	2,470,731
4	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_004	2,683,482	2,397,587

- IonTorrent 시퀀싱 데이터를 이용하여 *de novo* assembly를 수행하고자 다음과 같은 분석 파이프라인을 개발하였음
 - raw data QC: FastQC
 - Host DNA removal: bwa
 - low quality region trimming: Trimmomatic
 - de novo assembly: SPAdes
 - annotation/phylogentic analysis: BLAST



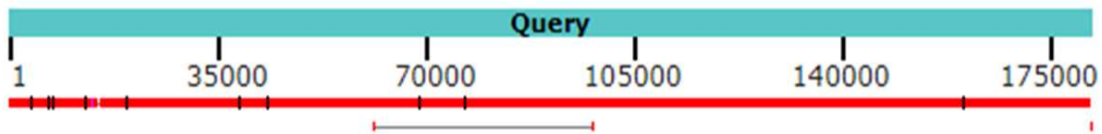
<그림> IonTorrent S5를 이용한 ASFV 시퀀싱 데이터 *de novo* assembly 및 분석 과정

- *de novo* assembly 결과 15번 라이브러리의 1번, 3번 데이터셋이 8개, 9개의 최소 Contig로 어셈블 되었음

#	ID	Reads(before QC)	Reads(after QC)	Contigs
1	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001	2,715,601	2,412,110	8
2	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002	2,793,805	2,475,815	786
3	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_003	2,741,046	2,470,731	9
4	S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_004	2,683,482	2,397,587	282

3.2 S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001 (8 Contigs)

Distribution of the top 36 Blast Hits on 3 subject sequences

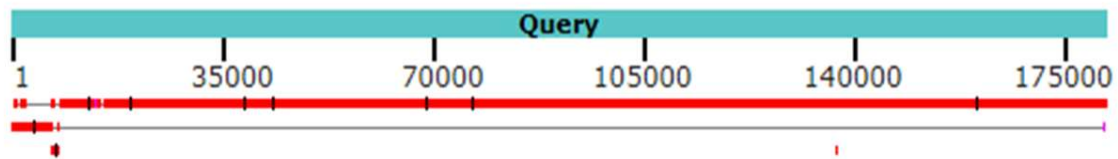


<그림> S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001의 BLASTN 결과

- Query: African swine fever virus strain Nu1986 (GenBank Accession, MW723482.1)
- Subject: S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001 (8 Contigs)
- NODE 1, 2, 3 만 match 됨
- 추가적인 Scaffolding 이 필요함

3.3 S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002 (786 Contigs)

Distribution of the top 38 Blast Hits on 5 subject sequences

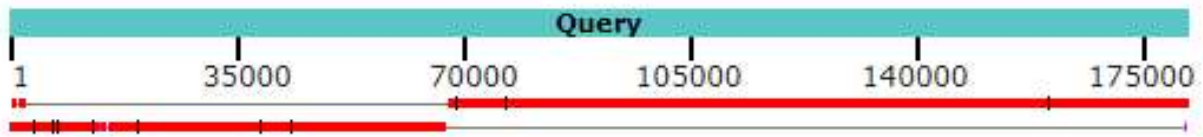


<그림> S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002의 BLASTN 결과

- Query: African swine fever virus strain Nu1986 (GenBank Accession, MW723482.1)
- Subject: S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002 (786 Contigs)
- NODE 1, 26, 149, 153, 786 만 match 됨
- 추가적인 Scaffolding 이 필요함

3.4 S5XL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_003 (9 Contigs)

Distribution of the top 35 Blast Hits on 3 subject sequences

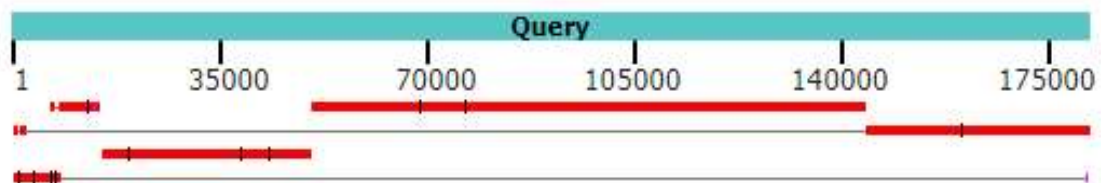


<그림> S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_003의 BLASTN 결과

- Query: African swine fever virus strain Nu1986 (GenBank Accession, MW723482.1)
- Subject: S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_003 (9 Contigs)
- NODE 1, 2, 3 match 됨
- 추가적인 Scaffolding이 필요함

3.5 S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_004 (282 Contigs)

Distribution of the top 38 Blast Hits on 5 subject sequences

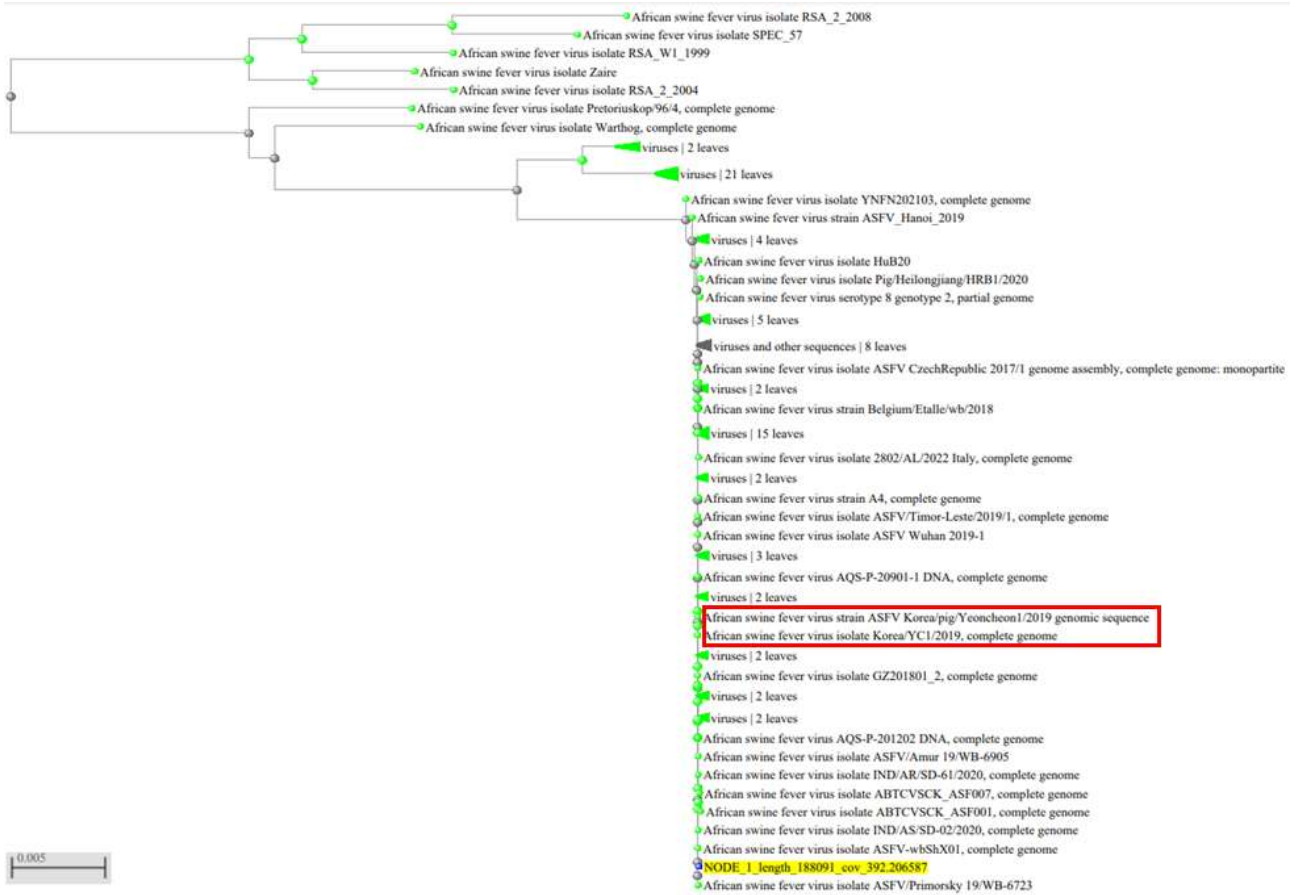


<그림> S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_004의 BLASTN 결과

- Query: African swine fever virus strain Nu1986 (GenBank Accession, MW723482.1)
- Subject: S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_004 (282 Contigs)
- NODE 1, 9, 10, 24, 37 만 match 됨
- 추가적인 Scaffolding 이 필요함

4) Phylogenetic Analysis 결과

- S5XL-0368-15-AFSV_2.lonXpress_001 (1 Scaffolds)



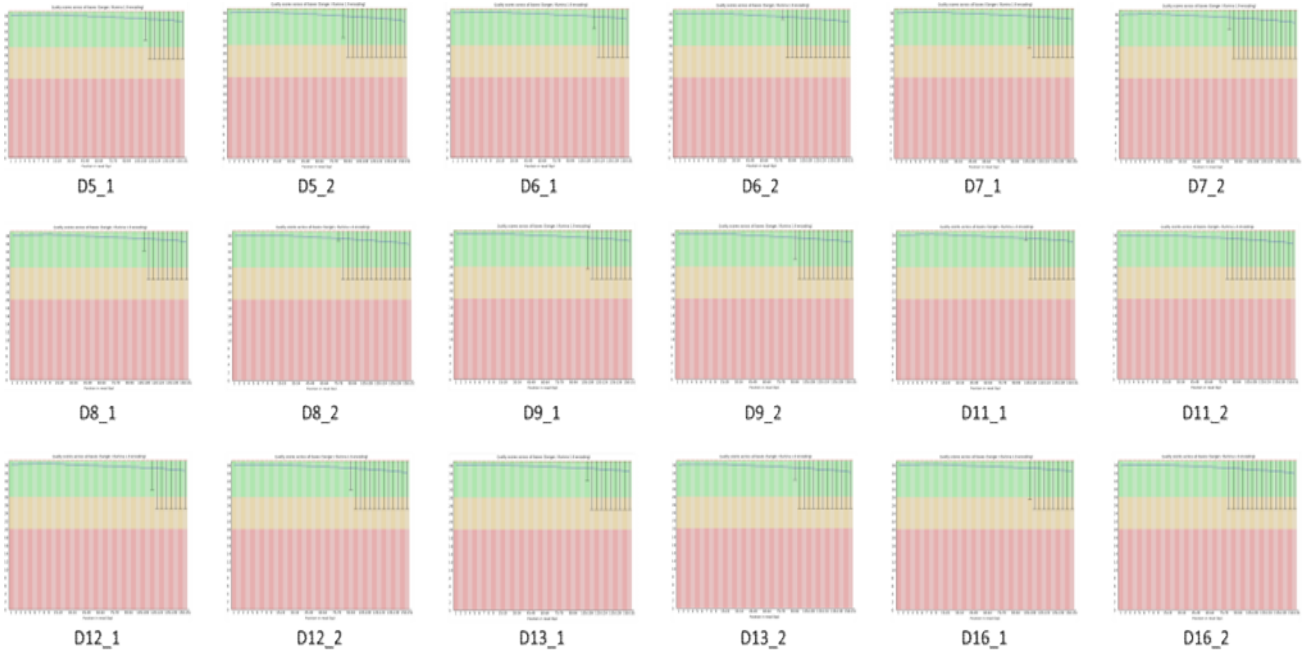
- 기존 국내분리주와 약간의 차이가 있었음

3) Illumina를 이용한 아프리카돼지열병 바이러스 검출 방법 개발

- 아프리카돼지열병 바이러스를 Illumina HiSeq X(Illumina) 플랫폼을 이용해 paired-end 시퀀싱하였음
- TruSeq Nano DNA Kit을 이용하여 라이브러리를 제작하였고, Read Length는 151bp였음

#	ID	Total bases(bp)	Reads(before QC)	Contigs
1	D4	6,227,697,530	41,243,030	38
2	D5	6,615,540,426	43,811,526	34
3	D6	6,686,579,886	44,281,986	30
4	D7	5,601,386,676	37,095,276	48
5	D8	6,336,986,800	41,966,800	
6	D9	6,684,846,708	44,270,508	
7	D11	5,699,408,326	37,744,426	76
8	D12	5,337,096,812	35,345,012	33
9	D13	5,441,197,420	36,034,420	35
10	D16	5,891,496,332	39,016,532	34
11	D17			
12	D18			
13	D19			
14	D20			
15	D21			

- FastQC를 이용한 QC 결과 모든 시퀀싱 데이터가 Phred Quality \geq 20이었음



<그림> Reads quality(before QC): Per base sequence quality with FastQC

- 어셈블 된 Contig와 Reference ASFV 서열(Georgia 2007/1 genome assembly (GenBank Accession, NC_044959.2)을 BLAST를 이용하여 비교한 결과 일부 Contig만 ASFV 서열을 포함하고 있었음

Job Title: NC_044959.2 |African swine fever virus

RID: [BVZ60KS9114](#) Search expires on 07-25 12:23 pm [Download All](#)

Program: Blast 2 sequences [Citation](#)

Query ID: Icl|Query_45026 (dna)

Query Descr: NC_044959.2 |African swine fever virus isolate ASFV Geor...

Query Length: 190584

Subject ID: Icl|Query_45028 and 2319 more subject(s) (dna)

Subject Descr: [See details](#)

Subject Length: 956846

Filter Results

Percent Identity: to

E value: to

Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Alignment Scores: ■ < 40 ■ 40 - 50 ■ 50 - 80 ■ 80 - 200 ■ >= 200

21 sequences selected

Distribution of the top 44 Blast Hits on 21 subject sequences

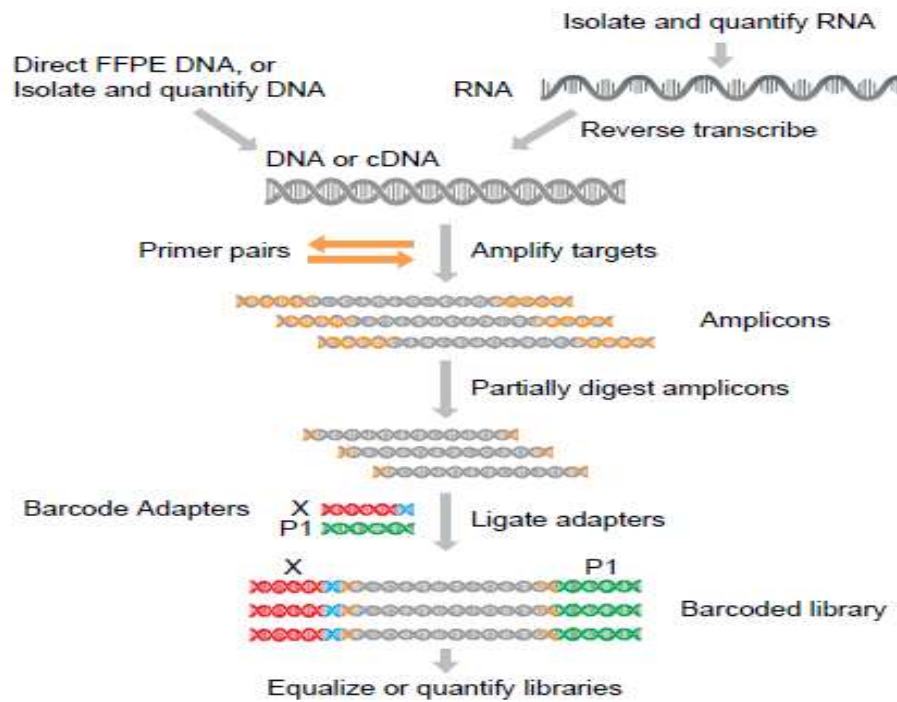
<그림> Query: African swine fever virus isolate ASFV Georgia 2007/1 genome assembly (GenBank Accession, NC_044959.2), Subject: D11 (2,320 Contigs)

4) AmpliSeq을 이용한 아프리카돼지열병 바이러스 검출 방법 개발

- 일반적으로 바이러스 전장유전체 시퀀싱을 위하여 NGS에서 random primer를 이용한 whole genome 시퀀싱을 실시함. 하지만 ASFV는 DNA 바이러스로서 배양할 때 사용된 숙주세포의 DNA가 포함되어 있어, 바이러스에 대한 whole genome 시퀀싱을 실시하였을 때 미량인 ASFV의 DNA는 시퀀싱이 거의 안되고, 숙주세포의 염색체에 대한 시퀀스가 대부분을 차지함.
- ASFV같은 DNA바이러스의 경우, 이를 극복하고자 캡처 프로브(capture probe)방식을 이용

하여 ASFV whole genome 시퀀싱을 시도되고 있음

- ASFV에 대한 전장유전체를 분석할 때, 일반적인 WGS 방법이나 캡처 프로브방식을 사용할 경우에도 마찬가지로 고농도의 DNA가 필요함.
- 야외에서 real-time PCR을 이용하여 검출된 ASFV가 포함된 시료의 경우, ASFV의 농도가 상당히 낮아 WGS가 매우 어려워 세포배양 등을 통해 농축할 필요가 있음.
- 바이러스의 농도가 낮은 경우나, 다른 불순물이 포함되고 배양되지 않은 상태의 바이러스에 대한 WGS가 가능한 NGS 플랫폼의 개발이 필요함.
- 바이러스의 전장유전체에 대한 multi-primer를 디자인하여 NGS를 이용한 WGS 플랫폼이 개발되어 사용되고 있음.



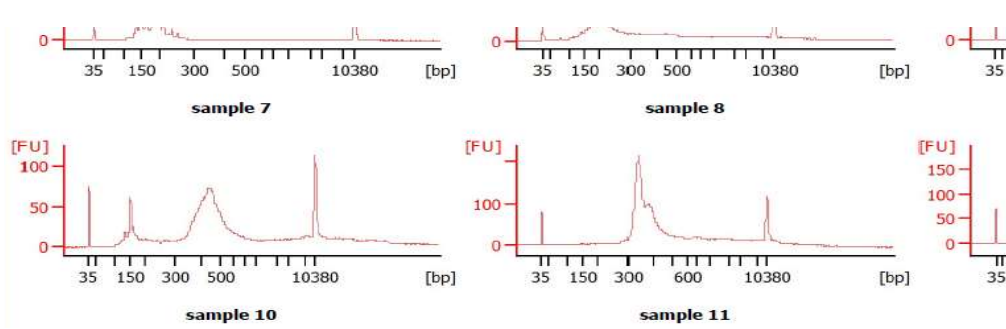
<그림> Ion AmpliSeq 진행과정 도식도

- 아프리카 돼지열병 바이러스는 이중가닥 DNA바이러스로서, 게놈의 길이는 분리주에 따라 약 170~193kbp이며 150~167개의 오픈 리딩 프레임을 포함하고 있고, ASFV 게놈은 왼쪽 가변 영역(LVR, 38~48kb), 중앙 보존 영역(C 영역, 약 125kb) 및 오른쪽 가변 영역(RVR, 13~22kb)으로 나누어져 있음.
- 본 발명에서 ASFV에 대한 multi-primer를 제작하여 AmpliSeq방식으로 전장유전체를 시퀀싱 방법을 발명하였음.

○ Ion Torrent NGS 라이브러리 제작

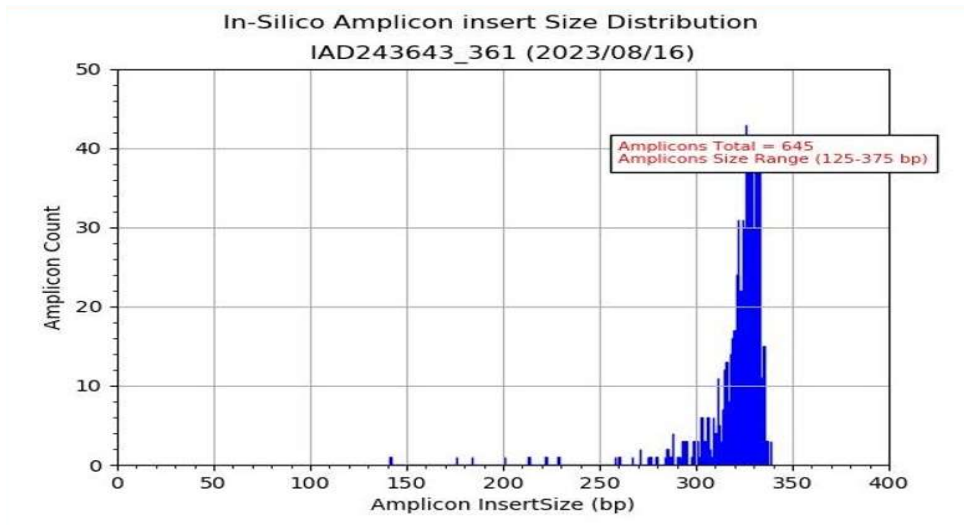
- 임상검체의 Whole genome sequencing을 위해 Ion Xpress Plus Fragment Library kit를 이용해 라이브러리를 제작함.

- Covaris M220 장비로 gDNA shearing 하고 End repair 진행 후 Barcode Adapter 를 ligation 하고 E-Gel 장비로 라이브러리 크기를 선별하여 증폭하고 Bioanalyzer 를 이용해 라이브러리 QC 를 진행함 (200 bp read 기준 330 bp 크기)



<그림> 제작한 라이브러리에 대한 Bioanalyzer 측정 예

- Ion Chef 및 Ion S5 장비 구동
 - 제작한 라이브러리를 Ion 530 chip 을 사용하여 분석함.
 - Ion chef 장비에 Ion 530 kit 를 장착하여 12-13 시간 반응 후, 다음날 S5 장비로 옮겨서 sequencing 을 진행함.
- ASFV 에 대한 AmpliSeq 을 이용한 WGS 결과
 - Amplicon size 결과



<그림> Amplicon insert size 분포

- ASFV WGS coverage 결과

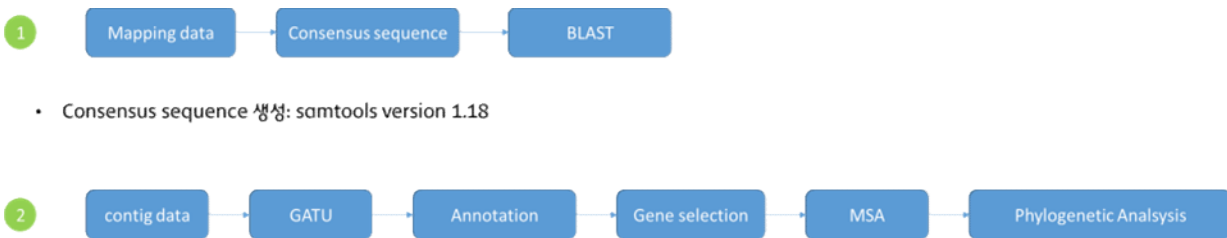
Type	Name	Chromosome	Chr_Start	Chr_End	Num_Amp	Total Base	Covered_Bases	Missed Bases	Overall_Covered_Bases
GENOME	ASFV II	ASFV_II	51	189,553	645	189,503	188,958	545	0.997

- IonTorrent를 이용한 시퀀싱 데이터의 어셈블 결과는 샘플간 편차가 크고, Illumina를 이용한 시퀀싱 데이터는 아프리카돼지열병 바이러스 capture 효율이 낮아 바이러스 서열을 어셈블할 수 없었음
- 이와 같은 NGS 플랫폼의 한계를 극복하기 위하여 amplicon 프라이머를 디자인하고 합성된 amplicon을 시퀀싱 및 어셈블하여 아프리카돼지열병 바이러스의 전장유전체 서열을 어셈블하는 기술을 개발하였음(특허출원, 2023)
- 시퀀싱은 IonTorrent(Thermo Fisher) S5 플랫폼을 이용하였음

#	ID	Total bases(bp)	Reads	coverage %
1	20231120_D05	2,672,897,913	11,663,496	85
2	20231120_D07	2,146,856,173	10,558,353	86
3	20231120_D18	865,467,993	3,419,564	45
4	20231120_PAJU	20,623,446	65,794	70
5	20231220_D18	3,322,666,419	13,975,206	59
6	20231220_PAJU	347,165,873	1,128,445	86

< 표 > NGS를 이용한 아프리카돼지열병 바이러스 AmpliSeq 결과

- AmpSeq 데이터로부터 Consensus 서열을 생성하고 Annotation 및 계통분석하는 과정은 다음과 같음



• Consensus sequence 생성: samtools version 1.18

<그림> ASFV 유전체 분석 과정 개념도

- 어셈블 된 Consensus 서열은 GATU(BMC Genomics 7:150.)를 이용하여 annotation을 수행하였음. 이때 Reference 서열은 African swine fever virus Georgia 2007/1 complete genome(NC_044959.1)을 사용하였음

▪ ASFV WGS 결과 예

<표> AmpliSeq 을 이용한 ASFV WGS 결과- 일부 시퀀스 예

```

TTATACAAAATCATATAATAAAGTGCGACAATCAACATATTAATCAACCACAGCATT
TTATGATGTGTTAATCAACATATACCATATTAATCAACCACAGCATTTTATGATGCGTCA
ATCAACATATTATTACGGAGAGCGTCAATCAATATAATATTGAGAACAGCGACTTGATA
CCGTGTATGGTGGTGGCGGCGGCATGTTGTTTGTAAACAGCATTTTTTCATCATTGAAG
CTTACAAAAGATATGTATAAGATAGCATATTAATGTTATTAACAGTAATATCAATAAGGC
GTAGCTATAGATCTTCACTTTGGTAGACCAATAATCCATGGTTGCGCTTAAAAATACCA
AAAAACATTAAGTTTTGGAGGGTAAGATTGGTTTTTACCATTGGTAAAGATTATTATT
CTAAATGTTTACCCCATAGATGTGAAACAATGATTCTTCATATATTAACATATTTTTTGA
CTTATACTTTTCTTCATCTAGTAAGGCGTTAATTTTTTCCGGATCTGTCGTTTTTATTGAT
AAAAGAGAAGAGTCTGGACTGTAATTTTTAAATAATAAGATATTTATTAATATCCAATTA
  
```

TTCGTTTGGCTCGCTATTTCCATGCTCTCTTCGAAAGCATCAGCTCCTAAATCTATACA
AAGGAATAAGTTACCTTCACAAAAATTCATTACCGAGGTAATCATTGCCCGATTAATGT
CAGCCCCAACATAAAAACAATAATATATAGTTGTATAATTACAATCATAACATACAGGCC
AACTGCATCATTTTCATCAATGTCTATATTTGTCTTCTCTTTGTTATAAATTTTCATGAAGGT
CAAAGACGTTGTTATAAGCAACCCACATATTAACCGCCAATCTTTAAAATGACTATAT
CGTTGATAAAAATATTGGATGGCTTCAGTAAGCTTATATAGTATCGCCATACTATACCA
ATACCTAGTTAGCATTTCGTTGAATGAAATATTATCCAATGTAAAGTTAATTGATAATGT
ATCTAGTTCACCAAAAATTCCTAATTTTCAGTTGAGCATTATTTAGGAAAAGGGGATTATC
AGATAATAATTCATGGCATAGAATAATATTACTGCTAGTTTTAACATACTGTACATTATA
AAATATTTCTAAAATTTTATTTTCACTCAAAGCTTTCCTCGCACCTAACTTTTGGCATAG
GTCTGGTGCACCTCCATATTGACAGTAACCAACCCAAAGCTGATGTCTGCACCCCAT
CGGTAAACAGCTCTATTAACCATGATTGTTTTCTGTACAGCCTTCATTAATGCAACA
TTAATGTTAAACCATGTTTAAACTTGCTGTTTTTATTAATATTTGTTTCATCTATACAAG
TATGATAAATCGTAATTGGGGCTTCATGCCACCACAACCCACAACGCTCTAAAATACA
ATAATCATCTTTTAAACACAGGCTGTGTAGCTAGTACTTTTTTAGTAAGTGCTTGTAAAGT
AGATGGCATCTTCTATCTGCAAAATAATTATTTCCGAAAAAAAAAATCAAATTAATAACT
AAATTCTATTTTTTTTTTAATAAAGCCTGTAAATTATATAATAAATCTCGCCACCGTATT
ATTTCCGGACACAACCTTTTTATACCTCATTATATTTTTAGATCTATAGTTTTTTAAACAAG
CATTATTTTTTCTGGATCTGTCGTTTTTAAAGATAAAAGAGAGACGTTTGAECTATAAT
AATCTTTAAATGATAATTTTCTACTAATATATCATGATTCTTTTGTGTTGCTAATTCTAA
GCTCTCTTCGAAAGCATTAGCTCCTAAATCTATACAAAAGAACAAGTTATTTCATATAAA
AGTTTTTTACCGAGGTAACCATTGCCCGATTGATGTCAGCCCCCAATACAAAACAATA
GTAAATGGTTAAAAAATTGCTATCTCTCATAACAGGCCAGATATATCATTTTCATCAATATT
CATATCAACCTTTTTTATATGATACATTTTCATGAAGATCAGACACGTTATTAAGAAGAAAG
CCCACATATTAGCCGCCAATCTTTAAAATGACTATATCGTTGATAAAAATATTGGATGG
CTTCAGTAAGCTTACATAGTATCGCTATACTATAACCAATATCTAGTTAGCATTTCGTTGA
ATGTTATTTTCATTCAATATAAAGTTGATCGATATCTTCTCTAGAAAACAACAATTATTA
CTTTTAATTCCTCTATATTCTGGAAAAGGGGATTATTAGATAACAATTTATGGCATAAAA
TAATATTACTACTAGTTTTAATACGATGATTTTTATAAAATATTTGTACAATATCCATTTTC
ATTCAAAATTTTTGCGCCTAACTCCCGGCAGAAATTCCAAGTATGCTCCGTATTGACAG
TGACTAAGCTAGAGTTGATGTCTGCACCCCATTCAGTAAACAACCTCTATTAGATCATAG
TTGTTTTCTGCACAGTTTTTCATTAATGCGAGATTTAACTCTAAACCATCTTTAAAATTT
GCTGATTTTATCATCAATTGATTATCCTCATTAGTAGAAAGCATAATTGGAGCTCCATG
CCACCACAAACCACAATATTTCAAATAAAGTAGTGTTCTTTAGATATGTGCTGTGTGG
CCAGTATTTTTTTAGCAAGAGCCTGCAGAGAAATTGGAGTAGACATATTTTTTTTTGCA
AAATGGTTTAAAGTTTTTCAAGAATACAGATTGGATAAATTAGGTTGTTGACTTAGTTACA
GGAGGTATTAATATTATGTAGACATAAAAATGAGATCCTCCAAAAAATAAACAACAA
AAAAAATATGTTAATATTAATAATGACAATTTCTACATTGCTTATTGCTCTTATTATACT
ACTTATTATTATTTTAGTAGTGTTTTTATACTATAAGAAACAACAACCACCGAAAAAGGT
CTGTAAAGTAGATAAAGATTGTGGTAGTGGAGAGCATTGTGTTTCGTGGATCATGTAGC
TCATTGAGCTGCTTAGATGCCGTAATAAATGGACAAACGAAATATTAAGATAGATTCTAA
GATTTCTCATGCGAATTCCTCCCAATTTTTACCGTTTTACGGATACTGCTGCTGATG
AGCAGCAAGAATTTGGAAAACACGGCATCCTATAAAAATAACTCCATCTCCAAGTGA
ATCCCATAGCCCCCAAGAGGTGTGTGAAAAATATTGTTTCATGGGGAACCGATGACTGT
ACAGGTTGGGAATATGTTGGTGTGAAAAGGAGGGAACATGTTATGTATATAATAATCC
ACATCACCCGTTCTTAATATGGTAAGGATCACATCATAGCCTTACCTAGAAATCATA
AACATGCATAAATAAATACATTAGGCT

▪ ASFV에 대한 3가지 WGS 결과 비교

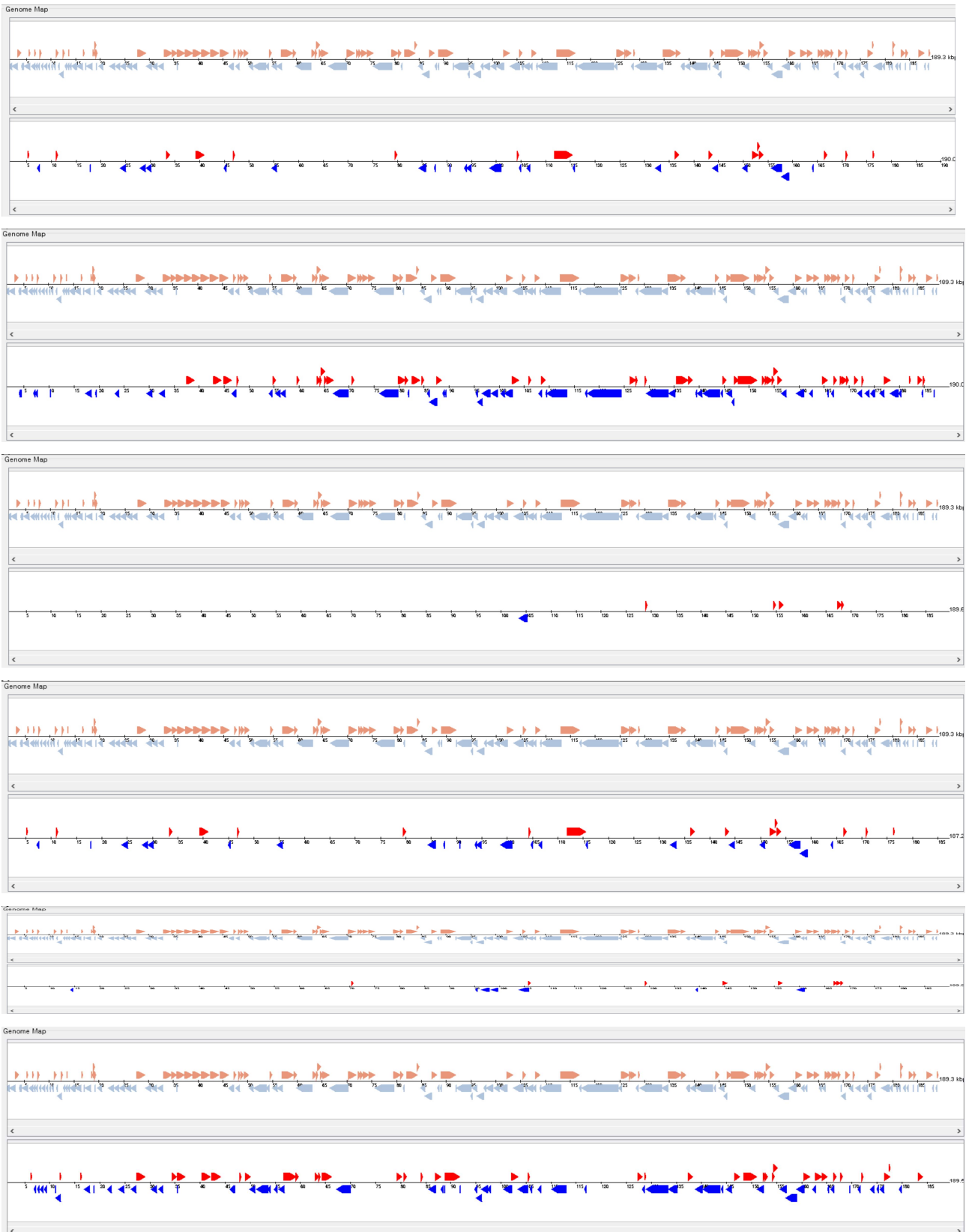
<표> ASFV에 대한 WGS 결과 비교

	WGS Method	Input DNA양 / 권장DNA양	Total bases (bp)	Reads (before QC)	Reads (after QC)	ASFV contigs	ASFV total bases	Overall covered bases (%)*
1	shot-gun WGS	1.4 ug (1,400ng) / 1 ug 이상	5.9 G	39,116,699	5,817,278	34	35	0.018%
2	Capture probe WGS	1.2 ug (1,200 ng) / 1 ug 이상	5.7 G	24,493,239	17,926,700	29	13,273	7.0%
3	AmpliSeq WGS	40 ng / 100 ng 이상	1.4G	6,426,802	6,426,802	1	188,958	99.8%

- 바이러스 WGS 적용에서 Shot-gun ASFV WGS와 Capture probe ASFV WGS의 경우, 1 ug 이상의 DNA양을 요구하며 이는 바이러스를 세포배양을 통해 증식시켜 농축시켜야만 얻을 수 있는 고농도의 양이다.
- 본 연구과제에서 개발한 AmpliSeq WGS의 경우 100 ng (기존 방법의 약 1/10, 실제로는 1/30도 가능)이 권장량이지만 40 ng을 이용하여 WGS를 실행하였을 때, 긴 contig를 얻었고, ASFV 전체 유전체의 99.8%가 증폭되었다. 기존의 방법은 세포배양을 통해 고농도의 바이러스를 얻어야만 하지만, 본 발명에서 개발한 AmpliSeq ASFV WGS의 경우, 적은 양의 DNA만 있으면 되므로 배양되지 않은 ASFV에 대해서도 WGS를 적용할 수 있다.
- Shot-gun ASFV WGS의 경우, input DNA의 양이 1 ug이 넘는 양을 이용하여 ASFV WGS를 분석 하였지만, 배양한 host 세포(돼지 세포)의 DNA가 대부분을 차지하여 약 0.02%만 ASFV의 시퀀스에 해당되었다.
- 배양한 숙주세포를 포함하는 경우, ASFV에 특이 probe를 사용하여 ASFV 시퀀스를 증폭 시도 하였을 때 ASFV의 시퀀스가 증폭이 되었다. 다만 shot-gun WGS보다는 나왔지만, ASFV 전체 유전체의 약 7.0%만 증폭이 되었다.
- 본 연구과제에서 개발된 AmpliSeq ASFV WGS는 적은 양의 DNA로도 WGS분석이 충분하여 배양 되지 않은 경우에도 적용가능하며, 숙주세포의 DNA가 오염되어 있는 경우에도 매우 뛰어난 시퀀싱 효율을 나타내었음.

5) ASFV WGS의 Annotation 분석

- BLAST 분석을 통한 Annotation을 수행하였음
- The annotation은 Genome Annotation Transfer Utility: BMC Genomics 7:150를 사용하여 수행하였음.
- Reference genome은 African swine fever virus Georgia 2007/1 complete genome(NC_044959.1)을 사용하였음



<그림> 아프리카돼지열병 바이러스 AmpSeq 어셈블 데이터의 annotation 결과: 1. 20231120_D05, 2. 20231120_D07, 3. 20231120_D18, 4. 20231120_PAJU, 5. 20231220_D18, 6. 20231220_PAJU, The annotation was performed using Genome Annotation Transfer Utility: BMC Genomics 7:150., Reference genome: African swine fever virus Georgia 2007/1 complete genome(NC_044959.1)

6) 아프리카돼지열병 바이러스의 계통분석

- 아프리카돼지열병 바이러스의 AmpSeq 결과를 이용하여 국내외 유행 종의 유전자형에 따른 계통분류를 수행하였음
- p72 유전자를 이용한 계통 분류
 - 총 26개 균주의 p72 유전자의 nucleotide 서열을 이용
 - 22개 균주(Trop AnimHealth Prod. 2021;53(4):438.) 서열을 NCBI로부터 다운로드하고, D05, D07, D18, PAJU 추가하였음

Name of the strain	GenBank accession number	Country of origin	Year of collection	p72 genotype	Length (bp)	Host species	Reference
Mkuzi1979	AY261362	South Africa	1979	I	192,714	Tick	Unpublished (Chapman et al., 2008)
Benin 97/1	NC_044956	Benin	1997	I	182,284	Domestic pig	(Chastagne et al. 2020)
Liv13/33(OmLF2)	MN913970	Zambia	1983	I	188,277	Tick	This study
MAL/19/Karonga	MW856068	Malawi	2019	II	183,325	Domestic pig	Unpublished (Chapman et al. 2011)
Arm/07/CBM/c2	LR812933	Armenia	2007	II	190,145	Domestic pig	Unpublished (Njau et al. 2021)
Georgia 2007/1	NC_044959.2	Georgia	2007	II	190,584	Domestic pig	Unpublished
ASFV-wbBS01	MK645909	China	2018	II	189,394	Wild boar	Unpublished
Tanzania/Rukwa/2017/1	LR813622	Tanzania	2017	II	183,186	Domestic pig	Unpublished
Warmbaths	AY261365	South Africa	1987	III	190,773	Tick	Unpublished
Warthog	AY261366	Namibia	1980	IV	186,528	Warthog	Unpublished
Tengani62	AY261364	Malawi	1962	V	185,689	Domestic pig	Unpublished
MalawiLil-20/1 (1983)	AY261361	Malawi	1983	VIII	187,612	Tick	Unpublished
Ken06.Bus	NC_044946	Kenya	2006	IX	184,368	Domestic pig	(Bishop et al. 2015)
R35	MH025920	Uganda	2015	IX	188,629	Domestic pig	(Masembe et al. 2018)
BUR/18/Rutana	MW856067	Burundi	2018	X	176,564	Domestic pig	This study
Ken05/Tk1	NC_044945	Kenya	2005	X	191,058	Tick	(Bishop et al. 2015)
ASFV Ken.rie1	LR899131	Kenya	2019	X	189,950	Tick	Unpublished

Uvira B53	MT956648	DRC	2019	X	180,916	Domestic pig	(Bisimwaet al. 2021)
Kenya 1950	AY261360	Kenya	1950	X	193,886	Domestic pig	Unpublished
Zaire	MN630494.2	DRC	1977	XX	184,820	Domestic pig	(Ndlovueta l. 2020a)
RSA_2_2004	MN641877.2	South Africa	2004	XX	189,903	Wild boar	(Ndlovueta l. 2020a)
RSA_2_2008	MN336500.3	South Africa	2008	XXII	190,066	Tick	(Ndlovueta l. 2020b)

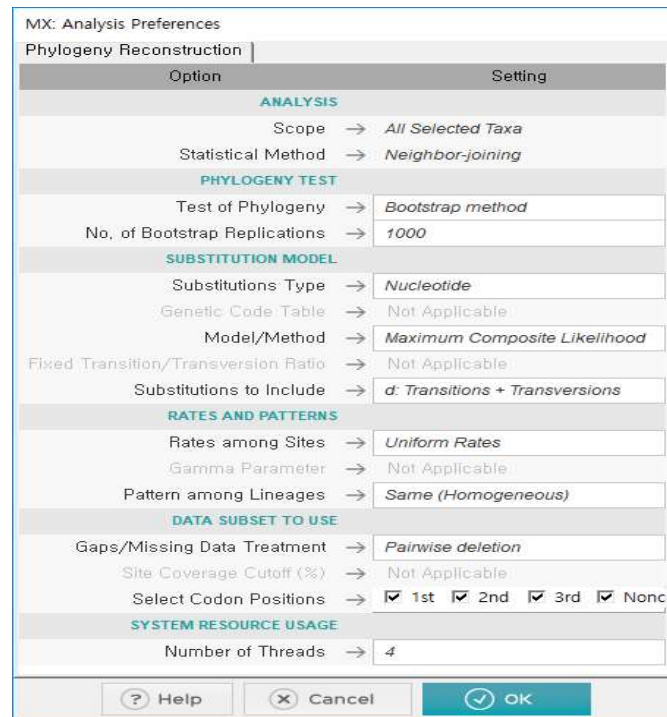
- MEGA-X를 이용한 다중서열정렬(Multiple Sequence alignment, MSA)

- 계통분석을 위한 다중서열정렬도구로 MEGA X(version 10.0.5)를 사용하였음
- 다중서열정렬알고리즘은 MUSCLE 알고리즘을 사용하였음
- 클러스터링 알고리즘으로는 Neighbor Joining 방법을 사용하였음
- 다중서열정렬결과는 mega 포맷으로 저장하였음

MX: Alignment Explorer (ASFV_p72_sum_Indel.meg)

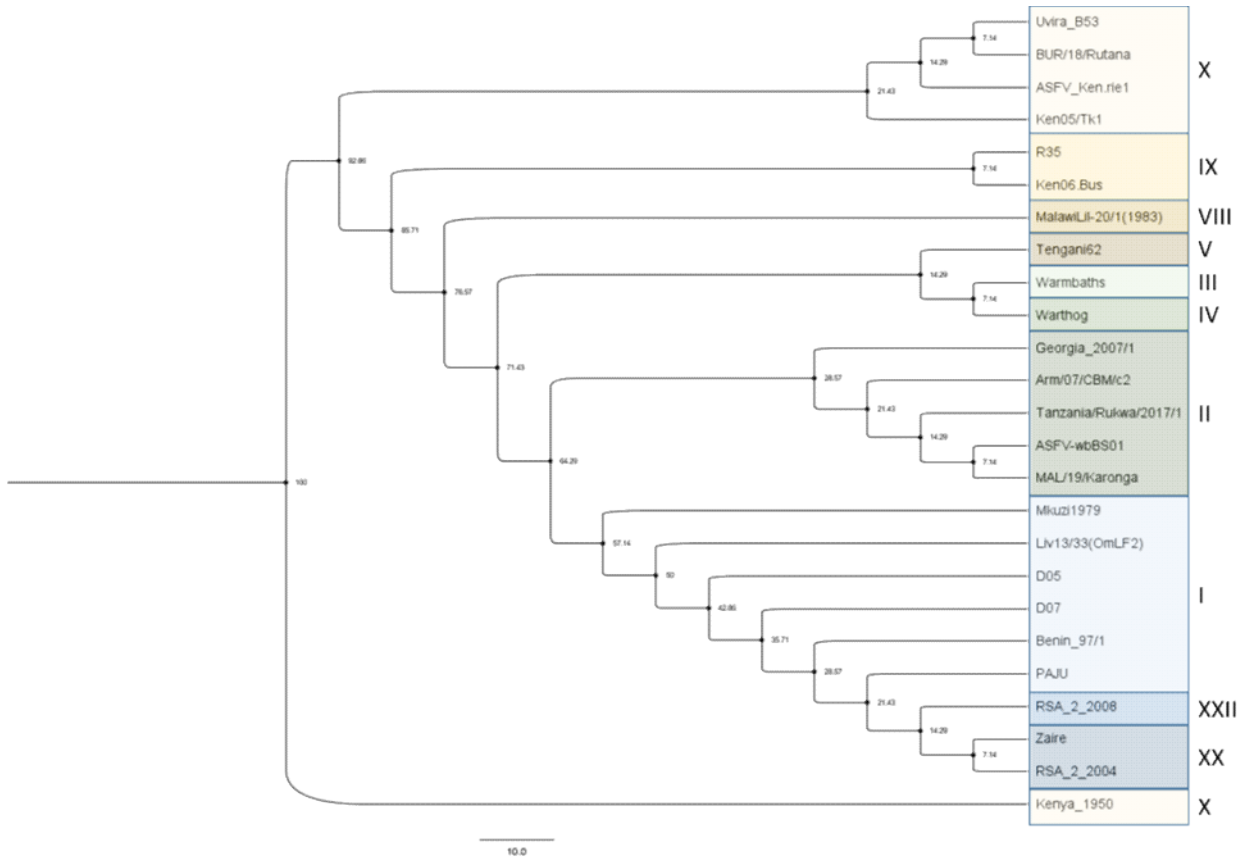
- 계통수 추정

- MEGA X(version 10.0.5)를 사용하여 다중서열정렬수행 후 MEGA X의 계통수 추정 도구를 이용하여 계통수를 추정하였음
- 계통수 추정을 위한 통계적 테스트 방법은 Neighbor-joining을 사용하였음
- 계통수 테스트는 Bootstrip방법으로 하였으며, 반복 횟수는 1,000번이었음
- 치환 모델은 Maximum Composite Likelihood를 사용하였고, Transition과 Transversion을 모두 포함하였음
- 계산 결과는 nexus 포맷으로 저장하였음
-



<그림> MEGA X를 이용한 계통수 추정 과정

- 계통수 추정 결과는 FigTree를 이용하여 가시화 하였음
- 계통수 추정 결과 본 연구개발에서 전장유전체 분석을 수행한 샘플들(D05, D07, PAJU)은 모두 p72 유전자 Genotype I에 해당하였음
- D18 샘플의 Contig에서는 p72유전자 서열을 확인할 수 없었으므로 계통분석에서 제외하였음

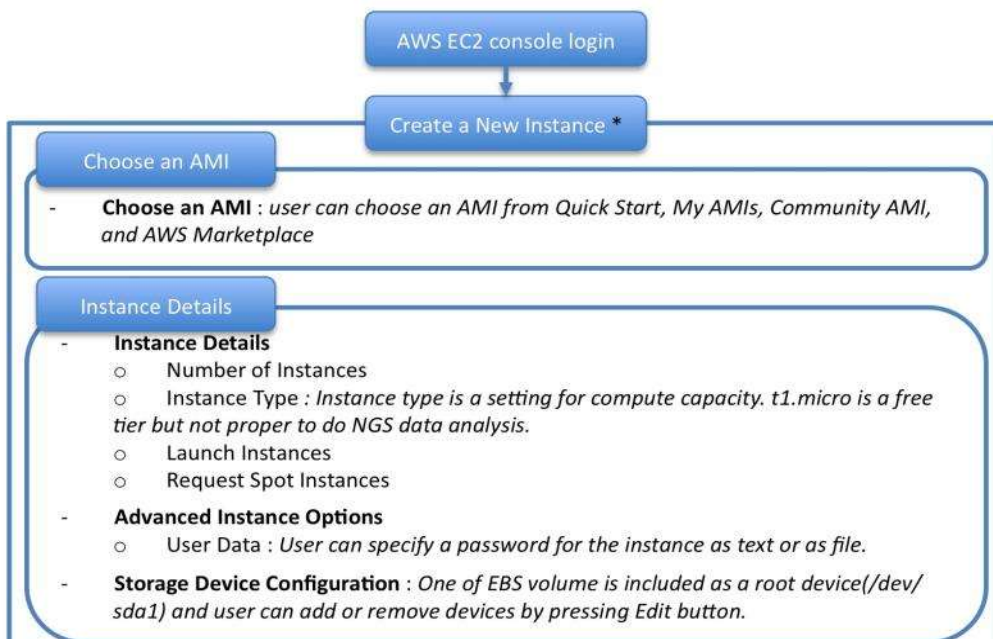


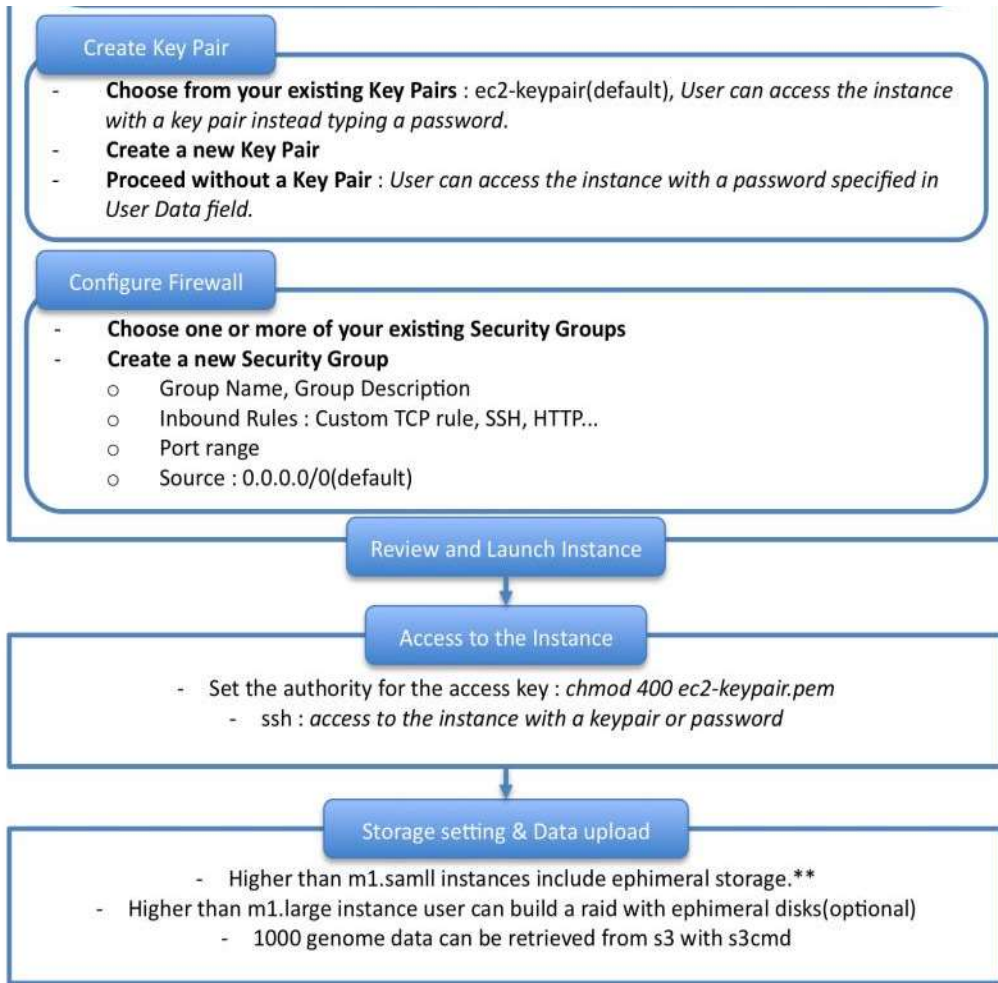
<그림> 국내외 유행 아프리카돼지열병 바이러스의 계통분류 결과

8) 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 빅데이터 공유 서비스 개발

○ 아마존 서비스를 이용한 웹서비스 구현

- 세계 최대 상거래 서비스인 아마존(미국)에서 2006년부터 개인과 기업에 제공해온 클라우드 컴퓨팅으로, Amazon Web Services(AWS)라고 부르며 웹 서비스 형태로 가상의 서버를 생성, 관리, 서비스할 수 있음
- AWS를 이용하여 가상 서버를 생성하기 위하여서는 다음의 단계를 거쳐야 함



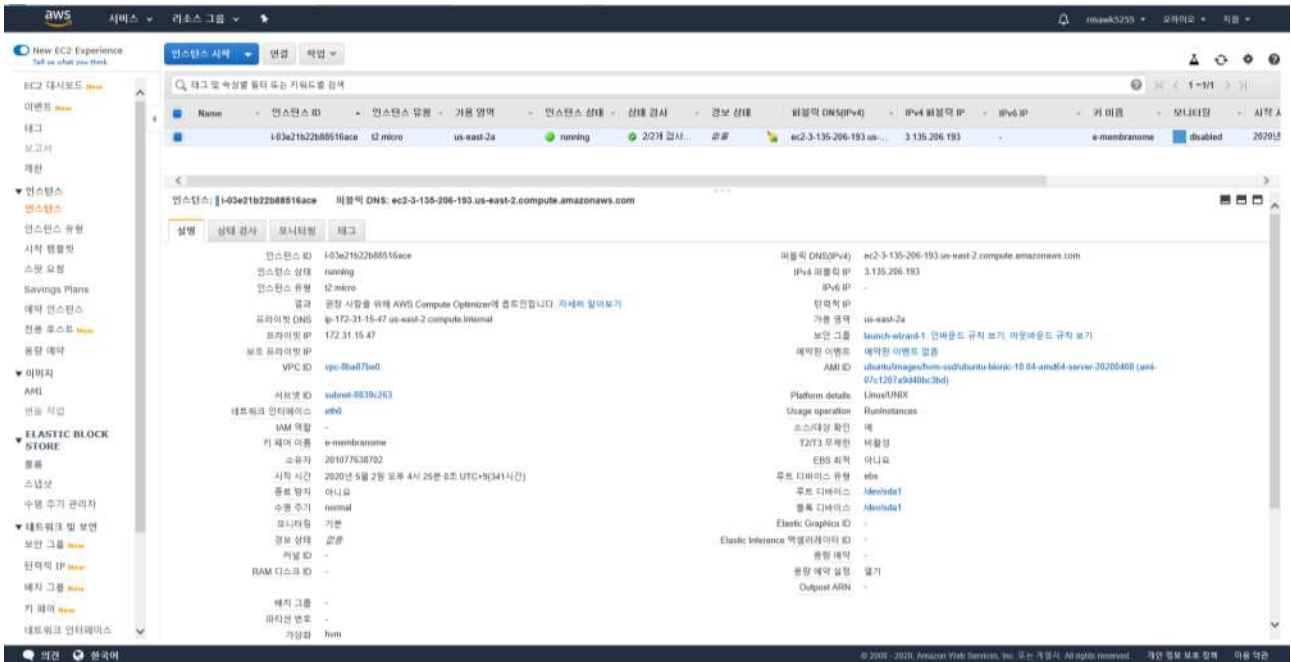


<그림> AWS의 EC2 서비스를 이용하여 가상 서버를 생성하는 과정(Genes Genom 37, 489,2015)

- AWS EC2 서비스를 이용하여 생성한 가상 서버의 설정은 다음과 같음

- 인스턴스 유형: t2.micro
- 운영체제: 우분투 18.04
- 인바운드 규칙

포트	프로토콜	소스	launch-wizard-1
80	tcp	0.0.0.0/0	✓
8000	tcp	0.0.0.0/0	✓
22	tcp	0.0.0.0/0	✓
3306	tcp	0.0.0.0/0, ::/0	✓
3000	tcp	0.0.0.0/0	✓



<그림> AWS EC2 서비스를 이용하여 생성한 가상 서버의 정보

○ uWSGI와 Nginx를 이용한 웹서비스

- 웹 서버 게이트웨이 인터페이스(WSGI , Web Server Gateway Interface)는 웹서버와 웹 애플리케이션의 인터페이스를 위한 파이선 프레임워크임
- 웹서버가 전달받은 사용자의 요청을 WSGI Server에서 처리하여 Django로 넘겨주고, 다시 Django가 넘겨준 응답을 WSGI Server가 받아서 웹서버에 전달하게 됨
- 웹 서버(Web Server)는 HTTP를 통해 웹 브라우저에서 요청하는 HTML 문서나 오브젝트 (이미지 파일 등)을 전송해주는 서비스 프로그램으로, 웹 페이지를 클라이언트로 전달하는 것이 주 기능임
- 본 사업에서는 웹 서버 게이트웨이 인터페이스로는 uWSGI를 사용하였고, 웹서버는 차세대 웹 서버 소프트웨어인 Nginx를 사용하였음

```

pip install uwsgi

# PPA 추가를 위한 필요 패키지
sudo apt-get install software-properties-common python-software-properties

# nginx 안정화 최신버전 PPA 추가
sudo add-apt-repository ppa:nginx/stable

# PPA 저장소 업데이트
sudo apt-get update

# nginx 설치
sudo apt-get install nginx

```

- uWSGI 설정: /etc/uwsgi/sites/asfv.ini

```
[uwsgi]
uid = ubuntu
project = test
#project = service
#app = asfv
app = mysite
base = /home/ubuntu/app/django

chdir = %(base)/%(project)
home = %(base)/%(project)/myvenv
#home = /home/ubuntu/.pyenv/versions/3.7.7/envs/mysite
module = %(app).wsgi:application

master = true
#processes = 16
processes = 1
threads = 2

thunder-lock = true
max-requests = 6000
max-requests-delta = 300

stat = /tmp/asfv.stats.sock
memory-report = true

hirakiri = 160
socket = %(base)/%(project)/%(project).sock
logto = %(base)/%(project)/uwsgi.log
#chown-socket = %(uid):%(uid)
chown-socket = %(uid):www-data
chmod-socket = 660
vacuum = true
touch-reload = %(base)/%(project)/%(app)/settings.py
```

- uWSGI 서비스 설정: /etc/systemd/system/uwsgi.service

```
[Unit]
Description=uWSGI Emperor service

[Service]
#ExecStart=/usr/bin/uwsgi --emperor /etc/uwsgi/sites
ExecStart=/home/ubuntu/app/django/service/myvenv/bin/uwsgi --emperor /etc/uwsgi/sites
Restart=on-failure
KillSignal=SIGQUIT
Type=notify
NotifyAccess=all
StandardError=syslog

[Install]
WantedBy=multi-user.target
```

- Nginx 설정: /etc/nginx/nginx.conf

```
user www-data;
#user deploy;
worker_processes auto;
#worker_processes 1;
pid /run/nginx.pid;
include /etc/nginx/modules-enabled/*.conf;

events {
    worker_connections 768;
    # multi_accept on;
}

http {

    ##
    # Basic Settings
    ##

    sendfile on;
    tcp_nopush on;
    tcp_nodelay on;
    #keepalive_timeout 65;
    keepalive_timeout 6000;
    types_hash_max_size 2048;
    # server_tokens off;

    #server_names_hash_bucket_size 64;
    # server_name_in_redirect off;

    include /etc/nginx/mime.types;
    default_type application/octet-stream;

    ##
    # SSL Settings
    ##

    ssl_protocols TLSv1 TLSv1.1 TLSv1.2; # Dropping SSLv3, ref: POODLE
    ssl_prefer_server_ciphers on;

    ##
    # Logging Settings
    ##

    access_log /var/log/nginx/access.log;
    error_log /var/log/nginx/error.log;

    ##
    # Gzip Settings
    ##

    gzip on;

    # gzip_vary on;
    # gzip_proxied any;
    # gzip_comp_level 6;
    # gzip_buffers 16 8k;
```

```
# gzip_http_version 1.1;
# gzip_types text/plain text/css application/json application/javascript text/xml application/xml
application/xml+rss text/javascript;

##
# Virtual Host Configs
##

include /etc/nginx/conf.d/*.conf;
include /etc/nginx/sites-enabled/*;
}
```

- uWSGI와 Nginx 실행

```
sudo systemctl daemon-reload
sudo systemctl restart nginx uwsgi
```

○ 장고(Django) 프레임워크를 이용한 웹서비스 구현

- 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 빅데이터 공유 서비스를 웹서비스로 구현하기 위하여 다음과 같은 도구를 사용하였음

- Python 3.6.9
- asgiref==3.2.7
- Django==3.0.5
- pkg-resources==0.0.0
- pytz==2020.1
- sqlparse==0.3.1

- 장고로 구현한 웹서비스 디렉토리 구조

```
+--/srv/asfv
+
+--/srv/asfv/apps.py
+--/srv/asfv/forms.py
+--/srv/asfv/models.py
+--/srv/asfv/settings.py
+--/srv/asfv/urls.py
+--/srv/asfv/views.py
+--/srv/asfv/wsgi.py
+
+--/srv/asfv/migrations
+
+--/srv/asfv/templates
+--/srv/asfv/templates/base.html
+--/srv/asfv/templates/home.html
+
+--/srv/asfv/templates/asfv
+--/srv/asfv/templates/asfv/index.html
+--/srv/asfv/templates/asfv/browse.html
+--/srv/asfv/templates/asfv/analysis.html
+--/srv/asfv/templates/asfv/search.html
+
+--/srv/mysite
```

```
+--/srv/mysite/settings.py
+--/srv/mysite/urls.py
+--/srv/mysite/views.py
+--/srv/mysite/wsgi.py
```

- 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 빅데이터 공유 서비스 화면

- 웹서비스 구현을 위한 Javascript 프레임워크로 부트스트랩 (<https://getbootstrap.com/>) v4.4.1을 사용하였음

```
<!DOCTYPE html>
<html lang="en">
<head>
  <meta charset="utf-8">
  <meta name="viewport" content="width=device-width, initial-scale=1">
  <title>{% block title %}ASFV database{% endblock %}</title>
  <link
                                                                    rel="stylesheet"
href="https://stackpath.bootstrapcdn.com/bootstrap/4.4.1/css/bootstrap.min.css">
  {% block extra-style %}{% endblock %}
</head>

... 중략

<script src="https://code.jquery.com/jquery-3.3.1.slim.min.js"></script>
<script src="https://cdnjs.cloudflare.com/ajax/libs/popper.js/1.14.7/umd/popper.min.js"></script>
<script src="https://stackpath.bootstrapcdn.com/bootstrap/4.3.1/js/bootstrap.min.js"></script>
<script src="https://kit.fontawesome.com/c998a172fe.js"></script>

{% block extra-script %}{% endblock %}

</body>
</html>
```

- 메인 화면



<그림> 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 빅데이터 공유 서비스 메인화면

9) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 유전체 기반 real-time PCR 검사 키트 개발

(1) ASFV 특이 프라이머 및 프로브 제작

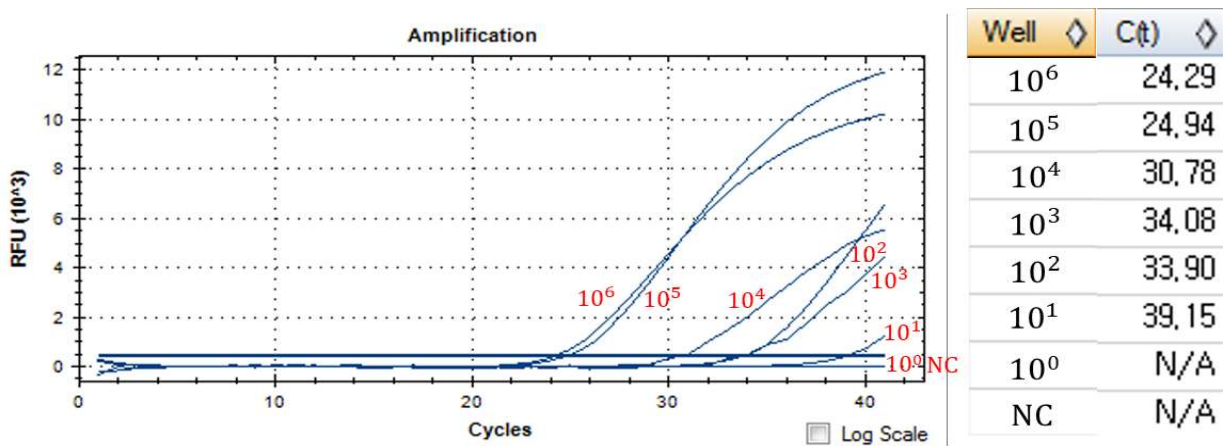
No	4	Oligo 이름	p72_2F			
5' - Oligo Seq - 3'						
GAATACCAACCCAGTGGTCATA						
5' Mod	3' Mod	GC(%)	Tm(°C)	Mer	Purification	Amount(umoles)
		45%	59.2 °C	22	MOPC	0.05

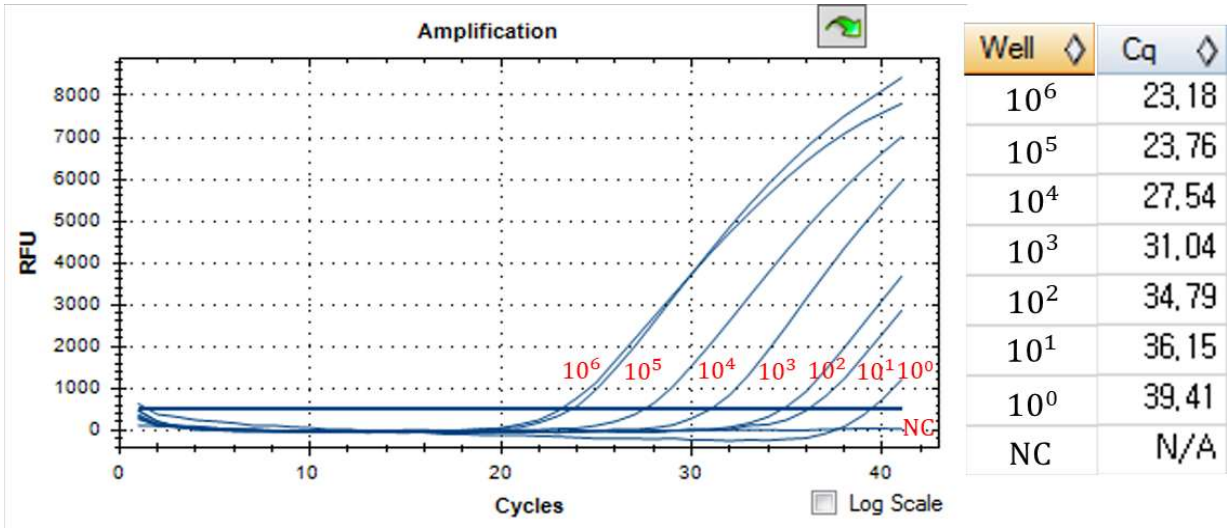
No	6	Oligo 이름	p72_2R			
5' - Oligo Seq - 3'						
CACAAAGATCAGCCGTAGTGATAG						
5' Mod	3' Mod	GC(%)	Tm(°C)	Mer	Purification	Amount(umoles)
		48%	58.8 °C	23	MOPC	0.05

No	5	Oligo 이름	p72_2P			
5' - Oligo Seq - 3'						
TTAGTTGGGACACGGATTACGTGGG						
5' Mod	3' Mod	GC(%)	Tm(°C)	Mer	Purification	Amount(umoles)
5' FAM	3' BHQ1	52%	65.9 °C	25	HPLC	0.2

No	5	Oligo 이름	p72_2P			
5' - Oligo Seq - 3'						
TTAGTTGGGACACGGATTACGTGGG						
5' Mod	3' Mod	GC(%)	Tm(°C)	Mer	Purification	Amount(umoles)
5' FAM	3' BHQ1	52%	65.9 °C	25	HPLC	0.2

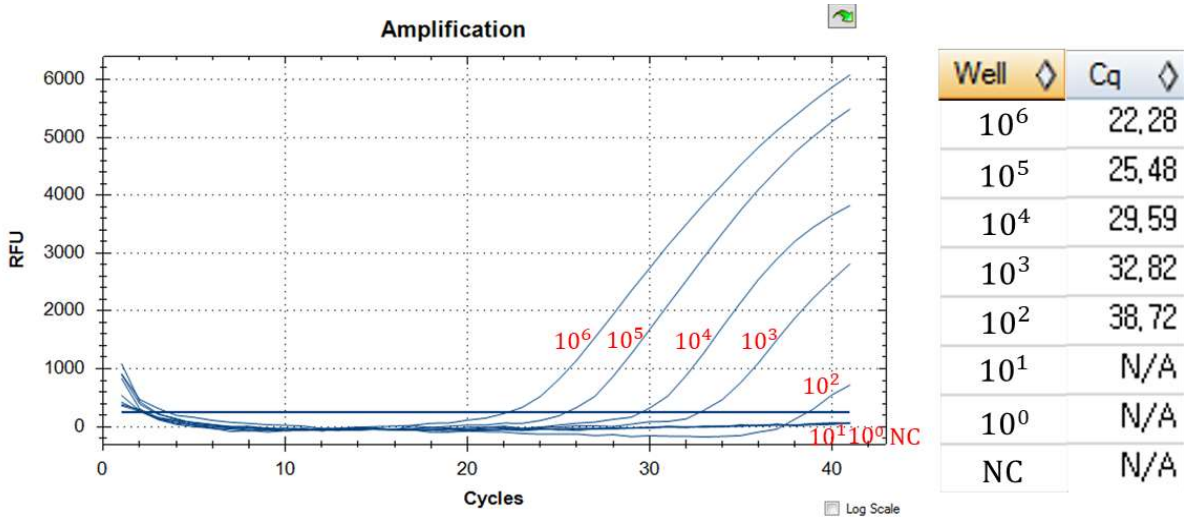
(2) ASFV 합성 DNA를 이용한 검출민감도 평가



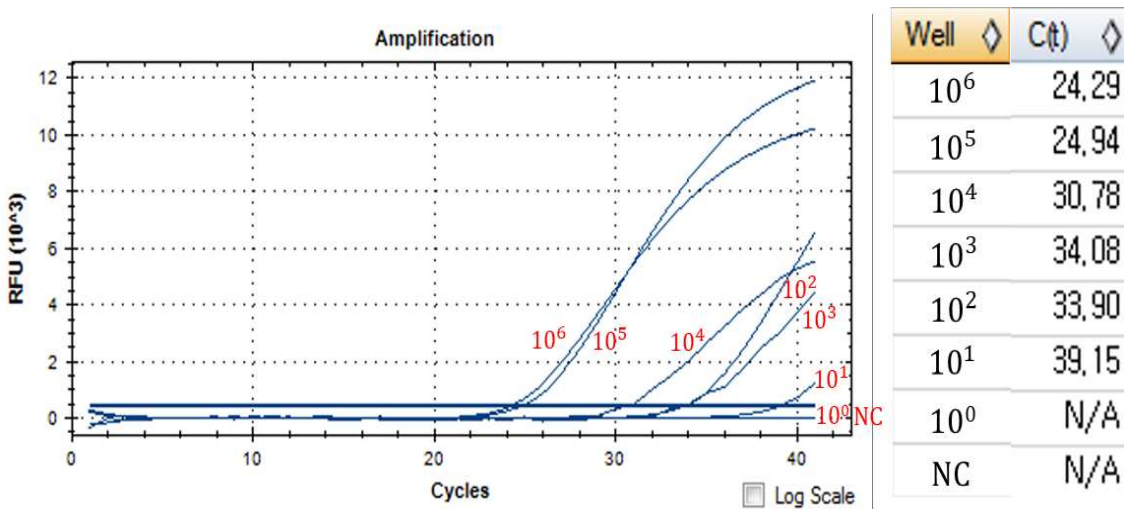


(3) ASFV 검출민감도 비교 평가

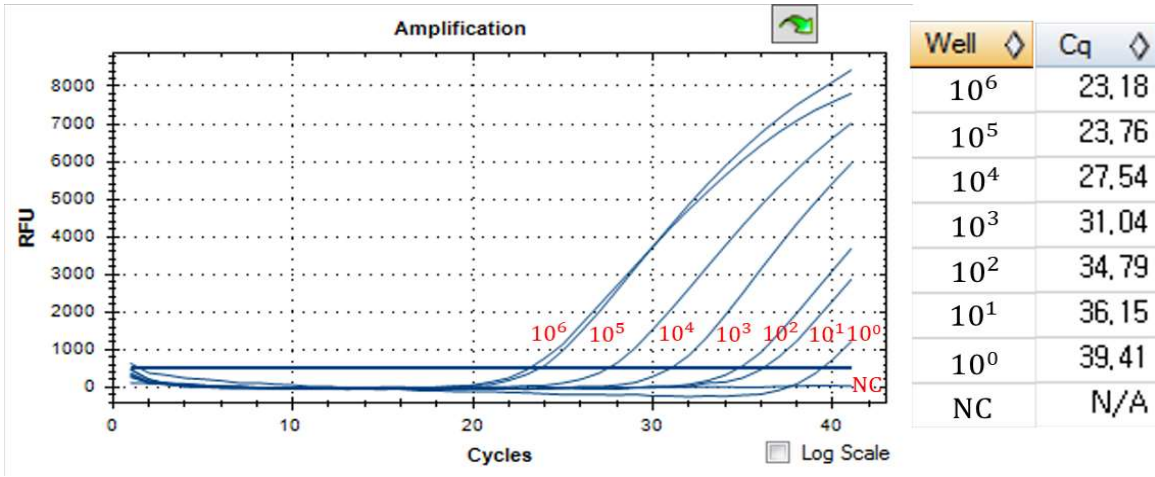
- ASFV 검출민감도를 개선하기 위하여 기존의 IIE 가이드라인에 있는 primers 와 probe 세트와 비교 평가하였음



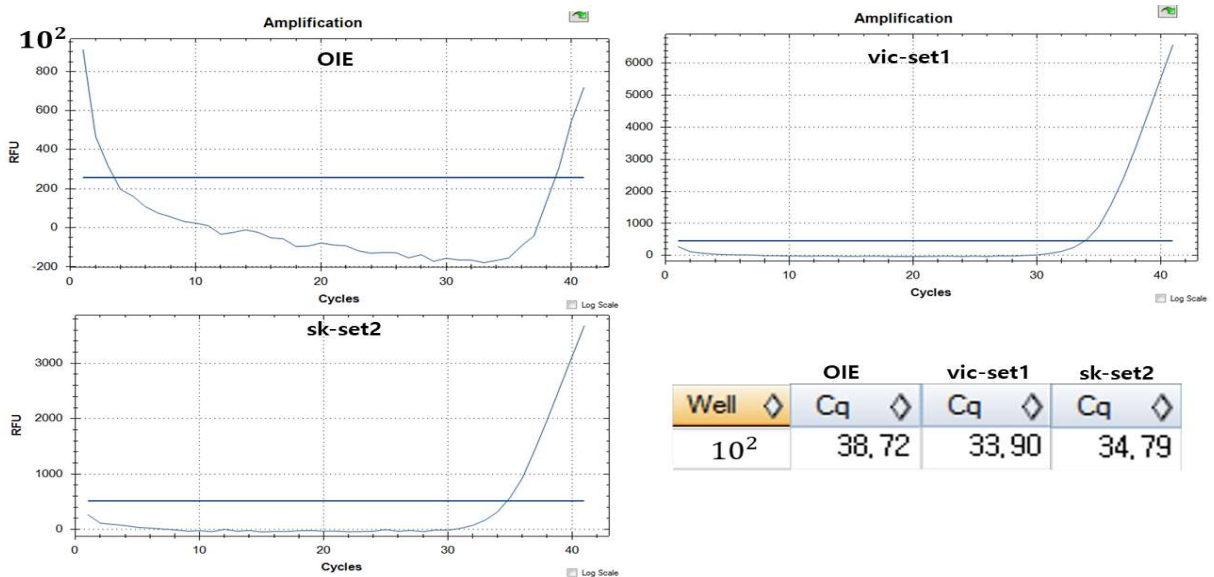
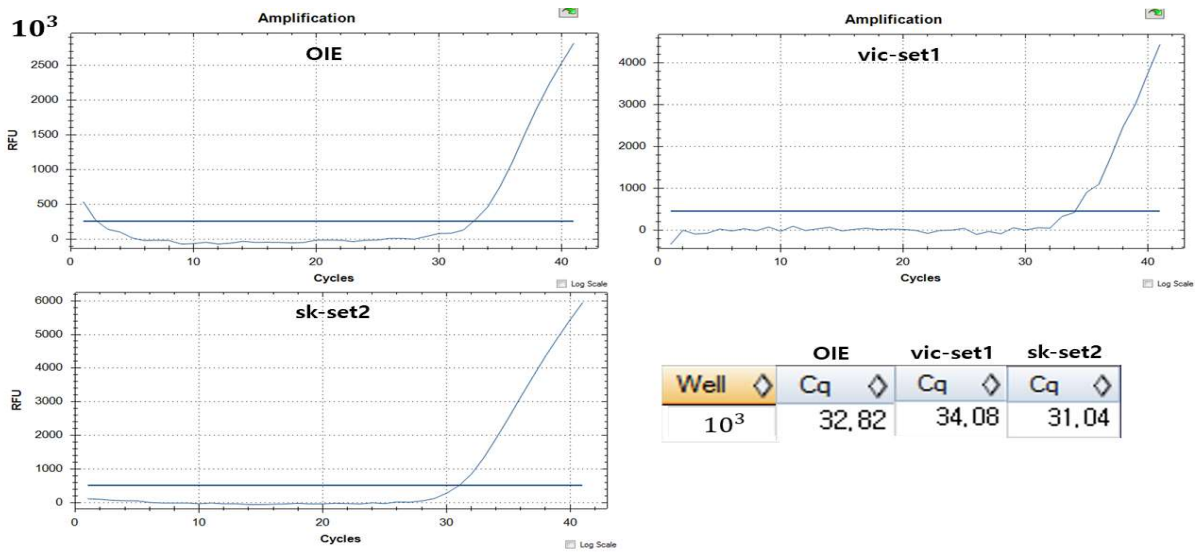
<그림> IIE 가이드라인 primers와 probe를 이용한 검출민감도 결과

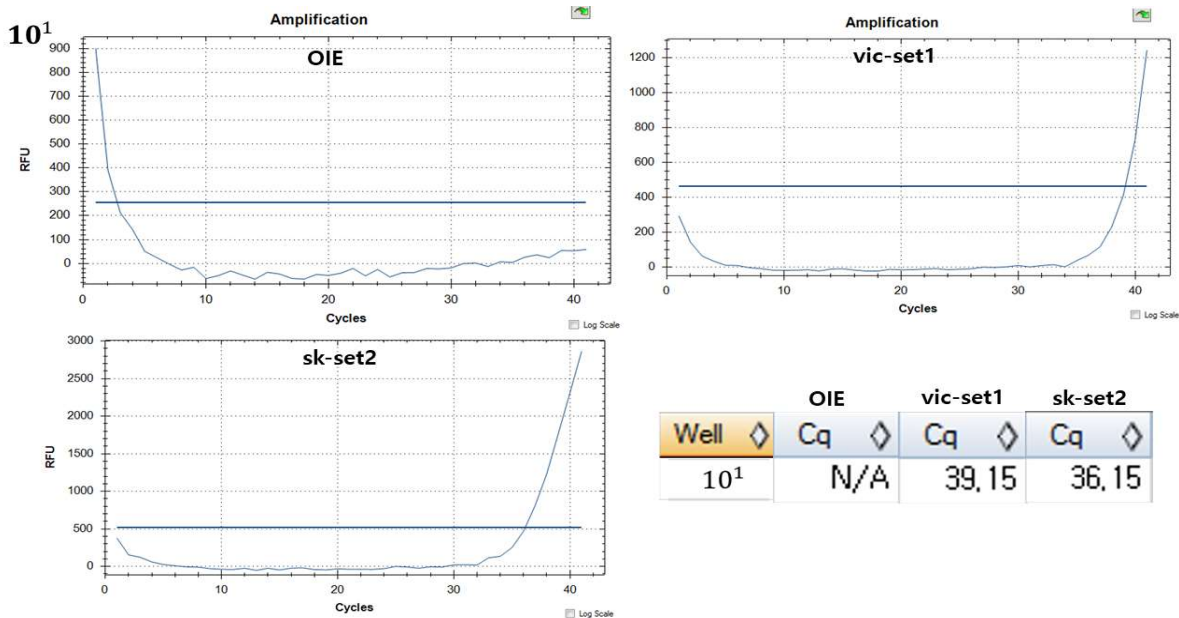


<그림> ASFV set 1 primers와 probe를 이용한 검출민감도 결과



<그림> ASFV set 2 primers와 probe를 이용한 검출민감도 결과

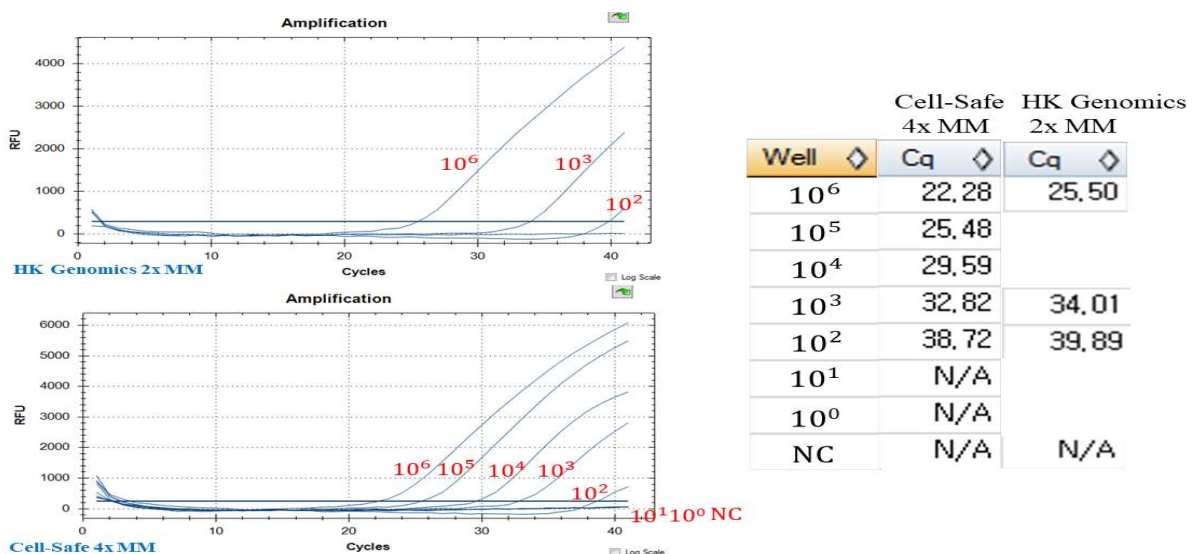




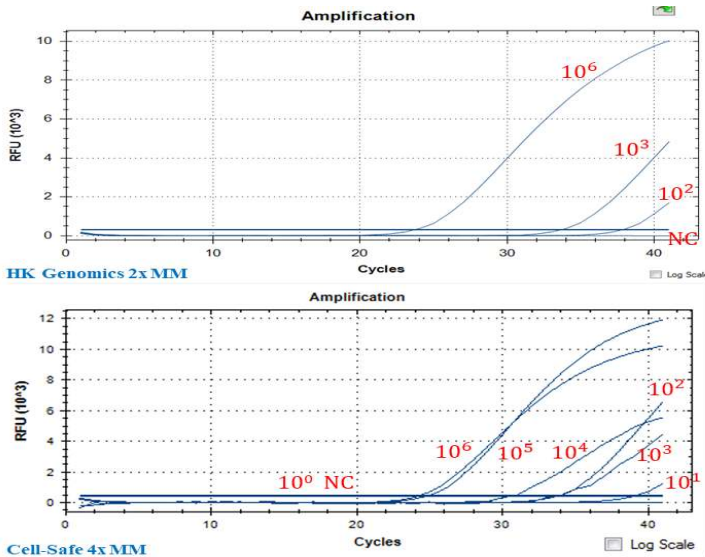
<그림> ASFV copy 수에 따른 primers와 probe 세트의 검출민감도 결과 비교

- ASFV copy 수에 따라 검출 민감도를 측정하였을 때, 1×10^3 copy수인 경우, OIE 가이드라인의 primer와 probe의 경우 Ct 값이 32.8이었고, 본 연구과제에서 개발한 primer와 probe 세트와 이와 유사한 34.1과 31의 Ct 값을 나타내었음
- ASFV copy가 1×10^2 copy수인 경우, OIE 가이드라인의 primer와 probe의 경우 Ct 값이 38.7이었으나, 본 연구과제에서 개발한 primer와 probe 세트는 33.9과 34.8의 Ct 값을 나타내어 더 높은 민감도를 나타내었음
- ASFV copy가 1×10^1 copy수인 경우, OIE 가이드라인의 primer와 probe의 경우 검출음성으로 나타났으나, 본 연구과제에서 개발한 primer와 probe 세트는 39.1과 36.1의 Ct 값을 나타내어 낮은 농도의 ASFV를 효율적으로 검출할 수 있었음

(4) ASFV 검출키트 개발을 위한 real-time 시약 최적화



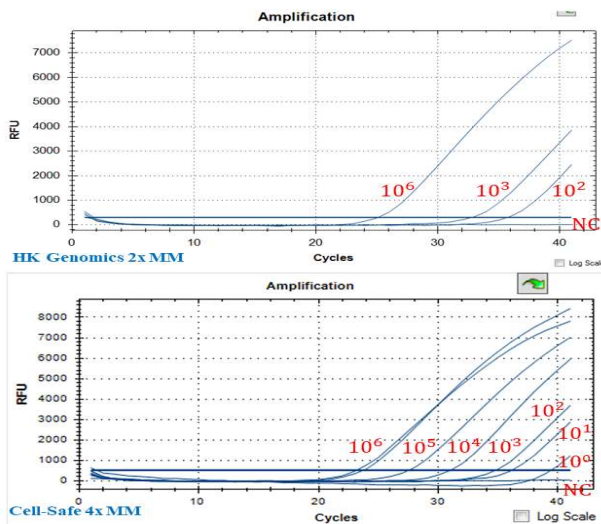
<그림> OIE 가이드라인 primers와 probe를 이용한 시약별 검출민감도 결과



Well	Cell-Safe 4x MM	HK Genomics 2x MM
	C _t	C _q
10 ⁶	24,29	23,66
10 ⁵	24,94	
10 ⁴	30,78	
10 ³	34,08	33,64
10 ²	33,90	37,78
10 ¹	39,15	
NC	N/A	N/A

3

<그림> ASFV set 1 primers와 probe를 이용한 시약별 검출민감도 결과

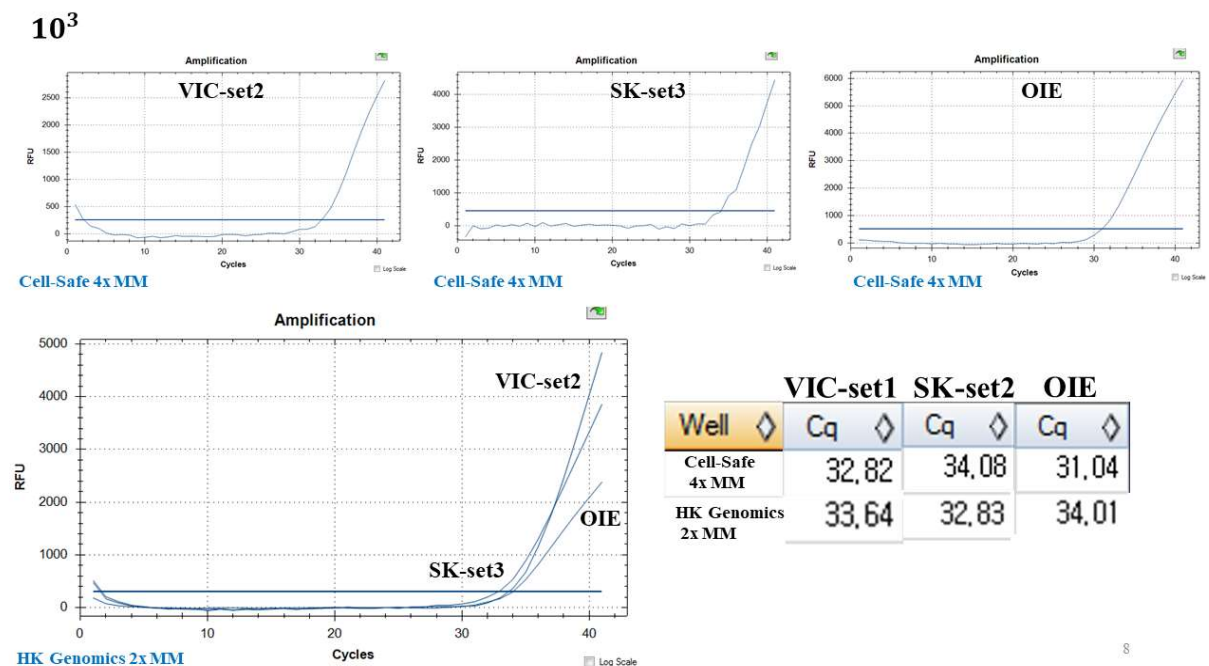


P72 SK set 2

Well	Cell-Safe 4x MM	HK Genomics 2x MM
	C _q	C _q
10 ⁶	23,18	25,11
10 ⁵	23,76	
10 ⁴	27,54	
10 ³	31,04	32,83
10 ²	34,79	35,74
10 ¹	36,15	
10 ⁰	39,41	
NC	N/A	N/A

4

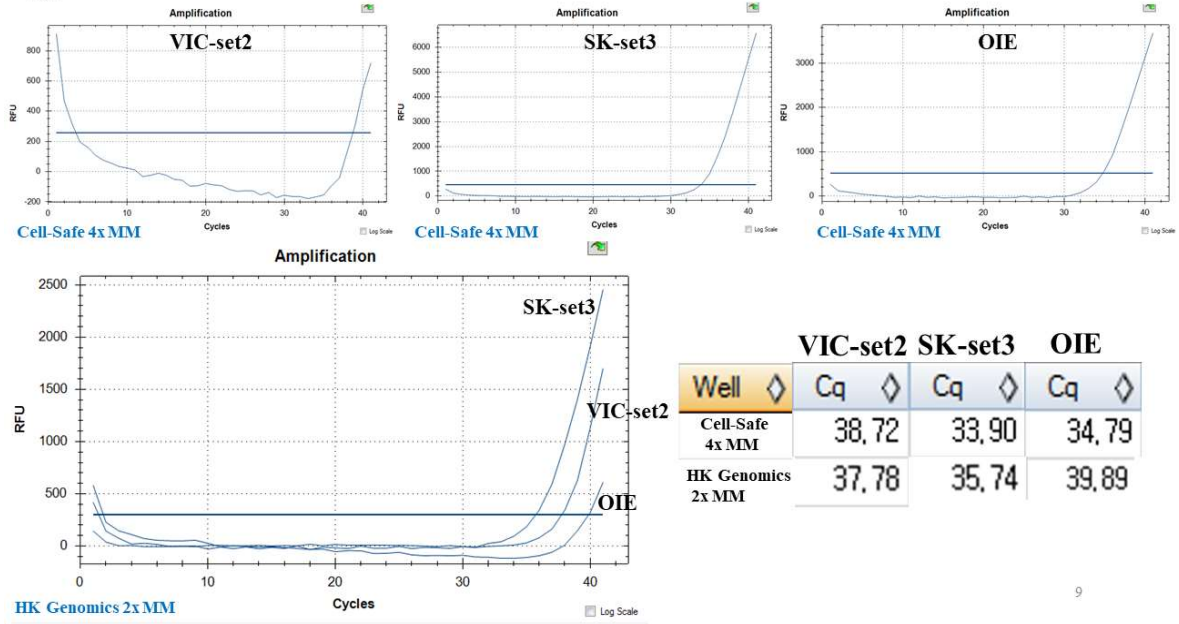
<그림> ASFV set 2 primers와 probe를 이용한 시약별 검출민감도 결과



Well	VIC-set1	SK-set2	OIE
	C _q	C _q	C _q
Cell-Safe 4x MM	32,82	34,08	31,04
HK Genomics 2x MM	33,64	32,83	34,01

8

10²

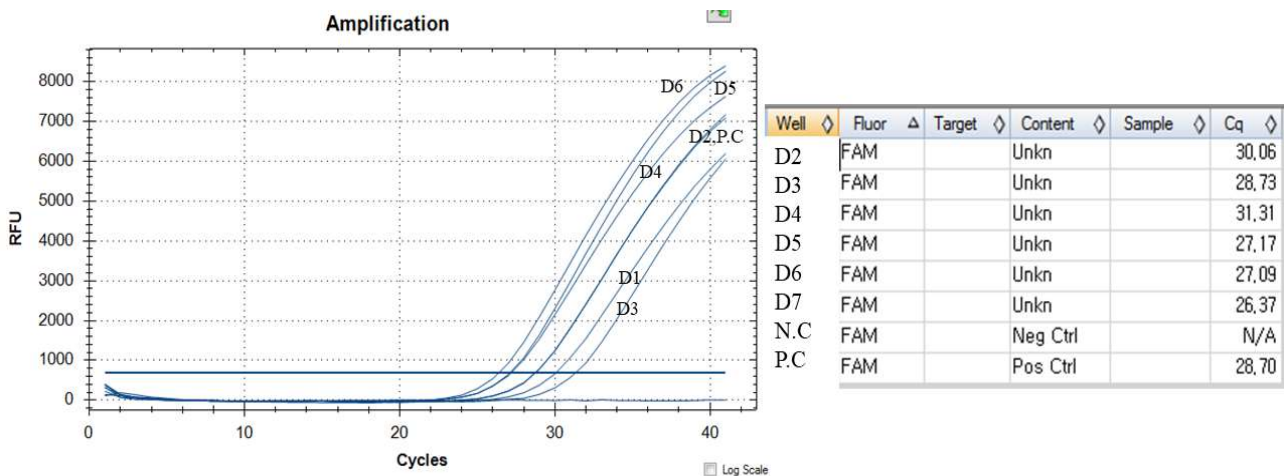


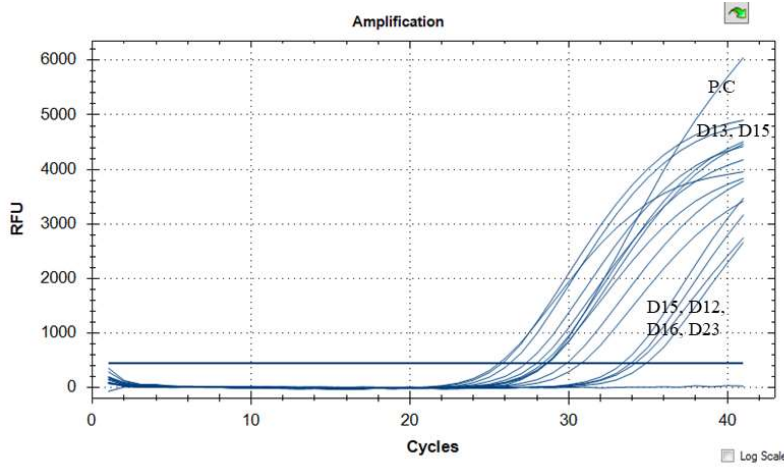
<그림> ASFV copy 수에 따른 시약별 검출민감도 결과 비교

- ASFV copy가 1x10³ copy인 경우, real-time PCR용 master mix의 제조사별로 primer와 probe 간에 유의한 차이는 나타나지 않았음
- ASFV copy가 1x10² copy로 낮은 경우, 본 연구과제에서 개발한 primer와 probe 세트는 Ct 값이 Cell-safe 4xMM의 경우 33.9 - 34.8로 안정적인 검출값을 나타내었으나, HK Genomics 2xMM의 경우 35.7 - 39.9로 다소 높은 Ct 값을 나타내었음

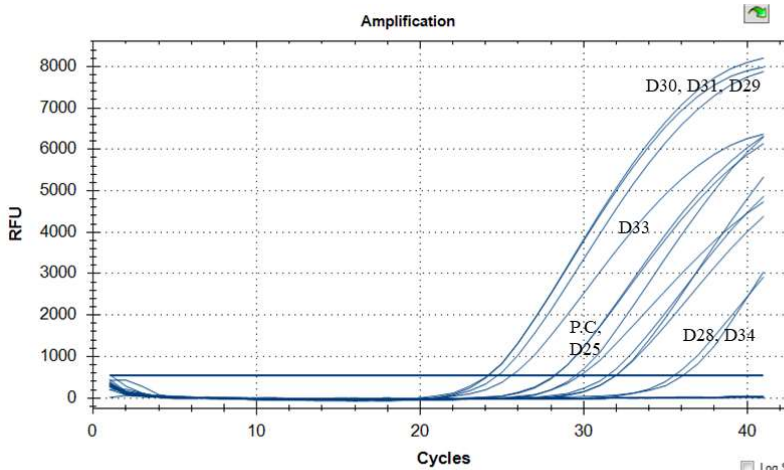
(5) ASFV 검출키트의 임상검체를 통한 평가

- 배양된 ASFV DNA와 인공적으로 감염시킨 돼지에서 추출한 DNA를 가지고 본 연구에서 개발한 ASFV real-time 검출키트를 평가함





Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
D8	FAM		Unkn		29.90
D9	FAM		Unkn		28.37
D10	FAM		Unkn		27.32
D11	FAM		Unkn		28.69
D12	FAM		Unkn		33.93
D13	FAM		Unkn		25.83
D14	FAM		Unkn		33.40
D15	FAM		Unkn		26.32
D16	FAM		Unkn		34.20
D17	FAM		Unkn		30.81
D20	FAM		Unkn		28.59
D21	FAM		Unkn		25.62
D22	FAM		Unkn		28.02
D23	FAM		Unkn		34.90
N.C	FAM		Neg Ctrl		N/A
P.C	FAM		Pos Ctrl		28.62



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
D24	FAM		Unkn		N/A
D25	FAM		Unkn		28.22
D26	FAM		Unkn		29.47
D27	FAM		Unkn		31.93
D28	FAM		Unkn		36.05
D29	FAM		Unkn		24.70
D30	FAM		Unkn		24.10
D31	FAM		Unkn		24.16
D32	FAM		Unkn		31.94
D33	FAM		Unkn		25.54
D34	FAM		Unkn		35.50
D35	FAM		Unkn		31.42
D36	FAM		Unkn		29.74
D37	FAM		Unkn		N/A
D38	FAM		Unkn		N/A
D39	FAM		Unkn		N/A
N.C	FAM		Neg Ctrl		N/A
P.C	FAM		Pos Ctrl		28.16

<그림> ASFV primers와 probe에 대한 임상검체를 이용한 평가

■ 양성 대조군에 대한 임상시험결과

번호	시험 물질	VetMax ASFV Detection Kit			ASFV real-time PCR Kit					
		FAM Ct value	VIC Ct value	판정 (Ct<45)	1차 테스트			2차 테스트		
					FAM Ct value	HEX Ct Value	판정 (Ct<40)	FAM Ct value	HEX Ct value	판정
1	D2	30.33	-	P	26.32	31.33	P	27.07	32.27	P
2	D3	28.14	-	P	25.35	30.57	P	25.40	30.87	P
3	D4	27.83	-	P	24.86	31.16	P	25.13	31.09	P
4	D5	26.95	-	P	24.22	29.94	P	24.45	30.21	P
5	D6	29.53	-	P	27.06	33.48	P	27.93	34.43	P
6	D7	29.13	-	P	26.23	31.66	P	26.87	32.43	P
7	D8	30.01	-	P	26.85	31.73	P	27.00	31.69	P
8	D9	26.50	-	P	24.10	29.23	P	24.04	29.29	P
9	D10	27.14	-	P	24.23	29.49	P	24.44	29.70	P
10	D11	32.44	-	P	29.51	33.24	P	30.61	33.79	P
11	D35	25.41	-	P	22.89	28.81	P	23.08	29.04	P
12	D36	30.46	-	P	27.66	32.55	P	28.44	33.08	P
13	D41	26.25	-	P	23.71	29.45	P	24.05	29.59	P

14	D42	29.08	-	P	25.64	29.59	P	26.17	30.23	P
15	D43	25.22	-	P	22.71	28.91	P	22.84	28.99	P
16	D44	25.10	-	P	22.38	28.69	P	22.59	28.96	P
17	D45	26.25	-	P	23.64	29.74	P	24.00	30.10	P
18	D46	26.39	-	P	24.02	31.63	P	24.08	31.53	P
19	D47	22.90	-	P	20.38	27.70	P	20.79	27.93	P
20	D48	23.25	-	P	21.18	28.16	P	21.14	28.19	P
21	D49	17.53	-	P	17.41	18.35	P	18.03	18.93	P
22	D50	23.53	-	P	22.43	28.46	P	22.50	28.62	P
23	D51	22.03	-	P	22.69	28.55	P	22.58	28.60	P
24	D52	21.99	-	P	19.92	20.78	P	19.95	20.82	P
25	D53	21.99	-	P	22.97	23.87	P	23.03	23.95	P
26	D54	16.64	-	P	15.90	16.75	P	16.04	16.97	P
27	D55	24.71	-	P	22.69	28.69	P	22.68	28.74	P
28	D56	26.14	-	P	24.21	29.35	P	24.15	29.29	P
29	D57	16.68	-	P	16.31	17.24	P	16.07	16.91	P
30	D58	25.84	-	P	23.70	29.10	P	23.63	29.15	P
31	D59	28.51	-	P	26.72	35.54	P	26.48	35.34	P
32	D60	25.76	-	P	23.53	29.27	P	23.50	29.40	P
33	D61	26.50	-	P	24.41	31.01	P	24.34	30.94	P
34	D12	38.86	-	P	-	-	N	34.15	37.63	P
35	D13	30.19	-	P	29.71	34.76	P	29.85	34.72	P
36	D14	34.03	-	P	35.67	40.38	P	33.14	40.87	P
37	D15	33.14	-	P	35.42	40.57	P	35.4	-	P
38	D16	35.05	-	P	37.28	-	P	33.21	40.33	P
39	D17	32.00	-	P	34.87	39.27	P	35.22	39.32	P
40	D19	31.67	-	P	35.61	-	P	36.27	-	P
41	D20	33.31	-	P	35.34	40.57	P	35.45	39.18	P
42	D21	34.34	-	P	35.14	-	P	31.54	36.47	P
43	D23	40.32	-	P	39.11	-	N	-	37.81	N
44	D25	32.60	-	P	29.31	35.32	P	31.05	36.46	P
45	D27	32.01	-	P	34.34	39.06	P	34.65	37.41	P
46	D28	31.52	-	P	34.9	39.16	P	35.08	37.91	P
47	D29	32.42	-	P	31.49	38.29	P	32.58	35.87	P
48	D30	29.08	-	P	32.85	39.82	P	34.92	38.57	P
49	D31	30.32	-	P	27.75	31.61	P	27.58	31.64	P
50	D32	30.91	-	P	32.35	36.78	P	32.14	35.22	P
51	D33	33.23	-	P	32.26	36.14	P	31.70	34.39	P
52	D34	33.78	-	P	32.06	34.02	P	32.14	34.37	P
53	Paju (10 ⁻³)	29.80	-	P	28.22	34.51	P	28.11	29.80	P
54	Paju (10 ⁻⁴)	32.94	-	P	31.23	36.11	P	31.10	32.94	P
55	Paju (10 ⁻⁵)	36.52	-	P	35.31	35.70	P	34.39	36.52	P

음성 대조군에 대한 임상시험결과

번호	시험 물질	VetMax ASFV Detection Kit			ASFV real-time PCR Kit					
					1차 테스트			2차 테스트		
		FAM Ct value	VIC Ct value	판정	FAM Ct value	HEX Ct Value	판정	FAM Ct value	HEX Ct value	판정
1	N1	-	-	N	-	24.59	N	-	27.22	N
2	N2	-	-	N	-	30.16	N	-	26.71	N
3	N3	-	-	N	-	29.19	N	-	25.53	N
4	N4	-	-	N	-	27.92	N	-	23.66	N
5	N5	-	-	N	-	25.65	N	-	24.65	N
6	N6	-	-	N	-	26.18	N	-	25.68	N
7	N7	-	-	N	-	28.16	N	-	26.45	N
8	N8	-	-	N	-	28.85	N	-	25.90	N
9	N9	-	-	N	-	27.75	N	-	24.81	N
10	N10	-	42.7	N	-	27.22	N	-	28.96	N
11	N11	-	-	N	-	31.73	N	-	27.87	N
12	N12	-	-	N	-	30.23	N	-	28.56	N
13	N13	-	-	N	-	30.93	N	-	24.43	N
14	N14	-	-	N	-	26.80	N	-	29.52	N
15	N15	-	-	N	-	31.81	N	-	27.86	N
16	N16	-	-	N	-	29.87	N	-	28.37	N
17	N17	-	-	N	-	31.22	N	-	25.93	N
18	N18	-	30.51	N	-	28.86	N	-	29.52	N
19	N19	-	25.74	N	-	31.83	N	-	29.03	N
20	N20	-	-	N	-	31.61	N	-	28.69	N
21	N21	-	35.69	N	-	31.14	N	-	27.07	N
22	N22	-	-	N	-	29.56	N	-	28.58	N
23	N23	-	-	N	-	31.64	N	-	29.92	N
24	N24	-	-	N	-	32.15	N	-	27.71	N
25	N25	-	-	N	-	30.28	N	-	27.20	N
26	N26	-	-	N	-	29.87	N	-	27.17	N
27	N27	-	-	N	-	30.04	N	-	29.99	N
28	N28	-	-	N	-	32.84	N	-	29.75	N
29	N29	-	-	N	-	32.57	N	-	27.59	N
30	N30	-	-	N	-	30.10	N	-	27.27	N
31	N31	-	-	N	-	30.08	N	-	28.12	N
32	N32	-	-	N	-	30.55	N	-	28.86	N
33	N33	-	-	N	-	31.22	N	-	26.89	N
34	N34	-	38.5	N	-	29.76	N	-	28.20	N
35	N35	-	33.58	N	-	30.93	N	-	28.59	N
36	N36	-	27.83	N	-	31.28	N	-	28.35	N
37	N37	-	-	N	-	31.28	N	-	22.81	N
38	N38	-	-	N	-	25.58	N	-	25.27	N
39	N39	-	36.14	N	-	27.90	N	-	28.56	N
40	N40	-	-	N	-	31.14	N	-	28.55	N
41	N41	-	-	N	-	31.53	N	-	24.77	N
42	N42	-	-	N	-	27.55	N	-	28.02	N
43	N43	-	-	N	-	30.79	N	-	28.88	N

44	N44	-	-	N	-	31.85	N	-	28.49	N
45	N45	-	-	N	-	31.43	N	-	25.69	N
46	N46	-	-	N	-	28.56	N	-	28.03	N
47	N47	-	-	N	-	30.89	N	-	29.41	N
48	N48	-	-	N	-	31.50	N	-	28.28	N
49	N49	-	-	N	-	30.73	N	-	30.04	N
50	N50	-	-	N	-	32.51	N	-	29.45	N
51	N51	-	-	N	-	32.11	N	-	29.08	N
52	N52	-	-	N	-	31.49	N	-	29.30	N
53	N53	-	-	N	-	31.97	N	-	30.16	N
54	N54	-	-	N	-	32.59	N	-	29.27	N
55	N55	-	-	N	-	32.29	N	-	26.12	N
56	N56	-	-	N	-	29.10	N	-	28.87	N
57	N57	-	-	N	-	31.29	N	-	27.42	N
58	N58	-	-	N	-	30.10	N	-	27.69	N
59	N59	-	-	N	-	30.18	N	-	27.33	N
60	N60	-	-	N	-	30.36	N	-	27.00	N
61	N61	-	-	N	-	29.52	N	-	26.53	N
62	N62	-	-	N	-	29.28	N	-	26.20	N
63	N63	-	-	N	-	28.78	N	-	26.59	N
64	N64	-	-	N	-	28.97	N	-	27.35	N
65	N65	-	-	N	-	31.13	N	-	28.09	N
66	N66	-	-	N	-	40.07	N	-	27.29	N
67	N67	-	-	N	-	29.74	N	-	28.54	N
68	N68	-	-	N	-	-	N	-	27.99	N
69	N69	-	-	N	-	31.49	N	-	27.95	N
70	N70	-	-	N	-	30.41	N	-	28.37	N
71	N71	-	-	N	-	31.78	N	-	28.49	N
72	N72	-	-	N	-	39.87	N	-	28.34	N
73	N73	-	-	N	-	33.53	N	-	26.45	N
74	N74	-	-	N	-	29.02	N	-	25.66	N
75	N75	-	-	N	-	27.72	N	-	26.01	N
76	N76	-	-	N	-	28.72	N	-	26.28	N
77	N77	-	-	N	-	28.51	N	-	26.43	N
78	N78	-	-	N	-	28.78	N	-	26.53	N
79	N79	-	-	N	-	29.16	N	-	26.25	N
80	N80	-	-	N	-	28.73	N	-	26.31	N
81	N81	-	-	N	-	-	N	-	28.39	N
82	N82	-	-	N	-	-	N	-	28.73	N
83	N83	-	-	N	-	-	N	-	30.05	N
84	N84	-	-	N	-	-	N	-	29.24	N
85	N85	-	-	N	-	-	N	-	28.04	N
86	N86	-	-	N	-	-	N	-	29.28	N
87	N87	-	-	N	-	30.98	N	-	27.48	N
88	N88	-	-	N	-	30.98	N	-	27.50	N
89	N89	-	-	N	-	29.98	N	-	27.65	N
90	N90	-	-	N	-	29.59	N	-	27.00	N
91	N91	-	-	N	-	28.25	N	-	25.85	N
92	N92	-	-	N	-	30.09	N	-	27.33	N

93	N93	-	-	N	-	32.25	N	-	28.15	N
94	N94	-	-	N	-	29.46	N	-	26.95	N
95	N95	-	-	N	-	28.67	N	-	26.48	N
96	N96	-	-	N	-	28.74	N	-	26.44	N
97	N97	-	-	N	-	27.51	N	-	24.97	N
98	N98	-	-	N	-	27.14	N	-	24.69	N
99	N99	-	-	N	-	26.58	N	-	24.16	N
100	N100	-	-	N	-	26.83	N	-	24.37	N

■ 대조제품의 결과 분석

		VetMax ASFV Detection Kit		ASFV real-time PCR Kit			
				1차 검사		2차 검사	
		양성	음성	양성	음성	양성	음성
시험물질 수	양성 (n=55)	55	0	53	2	54	1
	음성 (n=113)	0	113	0	113	0	113
합계	168	55	113	53	115	54	114

□ VetMax ASFV Detection Kit

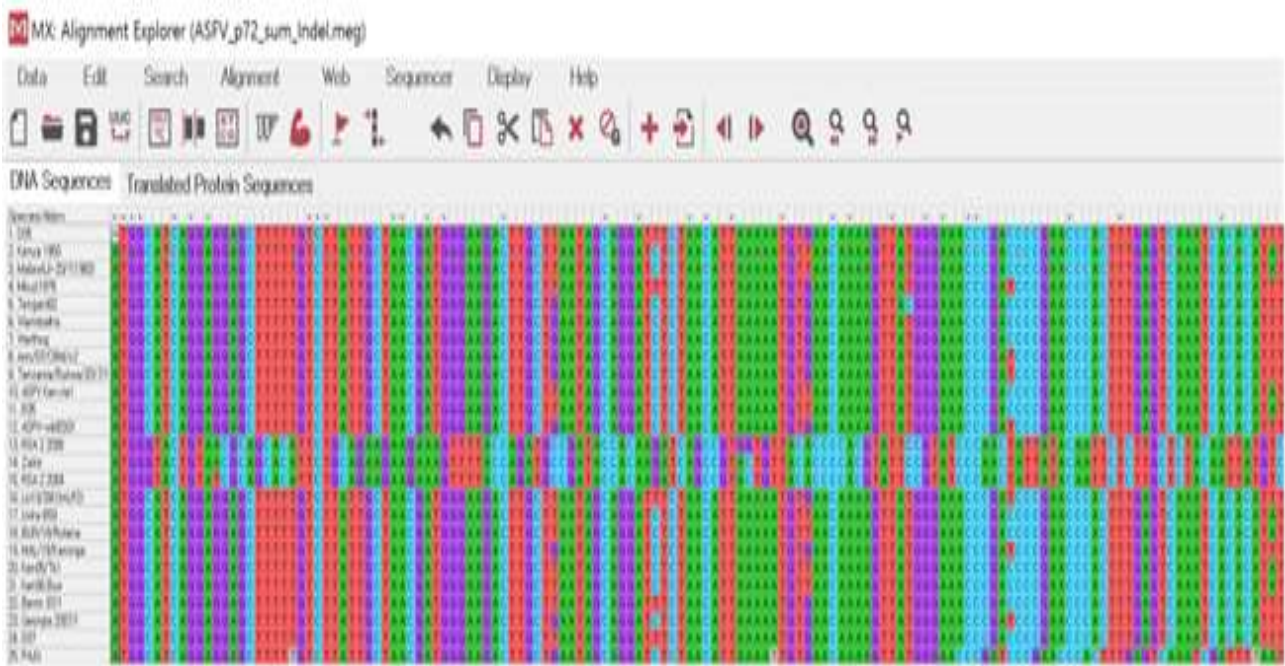
- 민감도(sensitivity) : 100% (55/55, 95% CI: 93.5 - 100.0)
- 특이도(Specificity) : 100% (113/113, 95% CI: 96.8 - 100.0)
- 양성예측도(PPV) : 100% (95% CI: 93.5 - 100.0)
- 음성예측도(NPV) : 100% (95% CI: 96.8 - 100.0)

□ ASFV real-time PCR Kit

- 민감도(sensitivity) : 97.3% (53/55, 95% CI: 88.9 - 99.8)
 - 1차 검사 : 96.4% (53/55, 95% CI: 87.5 - 99.6)
 - 2차 검사 : 98.2% (54/55, 95% CI: 90.3 - 99.9)
- 특이도(Specificity) : 100% (113/113, 95% CI: 96.8 - 100.0)
 - 1차 검사 : 100% (113/113, 95% CI: 96.8 - 100.0)
 - 2차 검사 : 100% (113/113, 95% CI: 96.8 - 100.0)
- 양성예측도(PPV) : 100% (95% CI: 93.3 - 100.0)
 - 1차 검사 : 100% (95% CI: 93.3 - 100.0)
 - 2차 검사 : 100% (95% CI: 93.3 - 100.0)
- 음성예측도(NPV) : 98.7% (95% CI: 94.5 - 99.9)
 - 1차 검사 : 98.3% (95% CI: 93.9 - 99.8)
 - 2차 검사 : 99.1% (95% CI: 95.2 - 99.9)

10) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 유전체 분석 결과를 활용한 등온증폭 진단기술 개발

- 본 연구개발에서 확보한 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 분석 결과를 활용하여 real-time 방식의 RT-LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 진단기술을 개발함
- 26개 아프리카돼지열병바이러스를 대상으로 유전자 상동성을 비교하여 conserved한 sequence에 대하여 프라이머를 디자인하였음

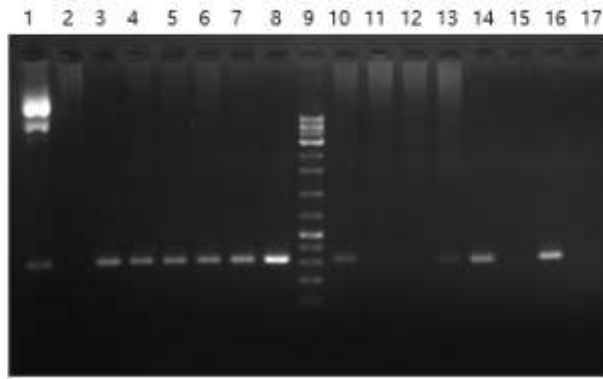


<그림> MSA results of ASF virus p72 segments

- p72 유전자에 대해 프라이머 간 거리 및 길이, Tm, GC 함량 등을 고려하여 최적의 프라이머 디자인(F3, B3, FIP, BIP, LF, LB)
- 고리매개등온증폭법(LAMP) 프라이머 디자인을 위하여 PrimerExplorer V5 software (<http://primerexplorer.jp/e/>)를 사용하였음

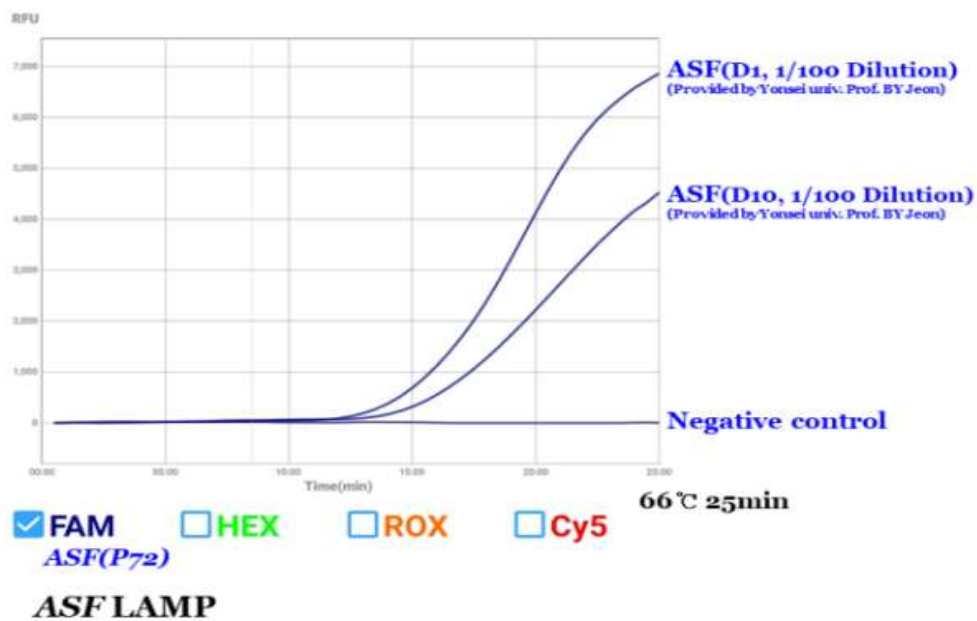
Target		Primer
p72 gene	F3	GACTTGAAGATGTCTTTGC
	B3	TGTTATTTGGATCCCCATT
	FIP	TTAGTCAGAGGTGACAGGATTG-CAGATCTTGAGGCTCTC
	BIP	TTGTGTTACGCTCACCGTG-TTTGGACAAAGCGTCTACG
	LF	GTCTTGTCTTTAGCCA
	LB	CAGTGAGCGAGGACTG

- 일반 PCR 프라이머와 전기영동을 이용하여 아프리카돼지열병 바이러스 검출 여부를 확인하였음



<그림> ASFV의 일반 PCR 결과

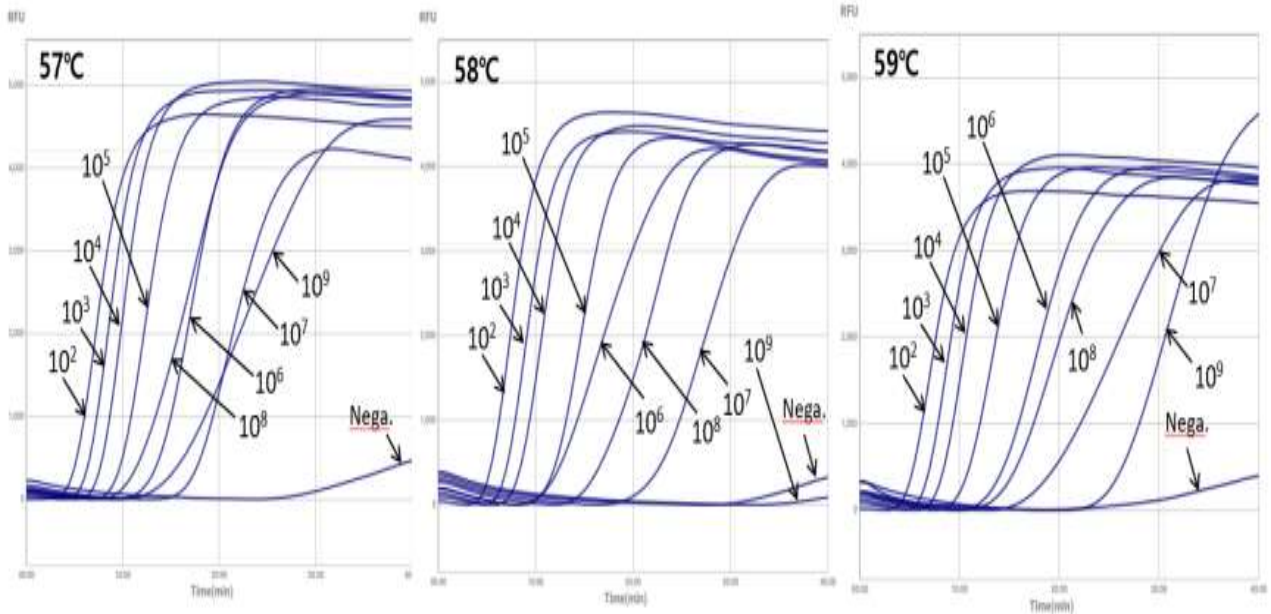
- LAMP 프라이머를 이용하여 아프리카돼지열병 바이러스 검출 여부를 확인하였음



<그림> ASFV의 RT-LAMP 결과

- 아프리카돼지열병 바이러스 진단용 LAMP primer의 검출한계 실험

- Real-time LAMP 진단용 프라이머의 성능을 확인하기 위하여 아프리카돼지열병 바이러스의 인공합성핵산을 이용하여 최소검출한계를 측정하였음
- LAMP 프라이머의 성능을 확인하기 위하여 template DNA 농도와 온도에 따른 LAMP 결과를 비교하였음

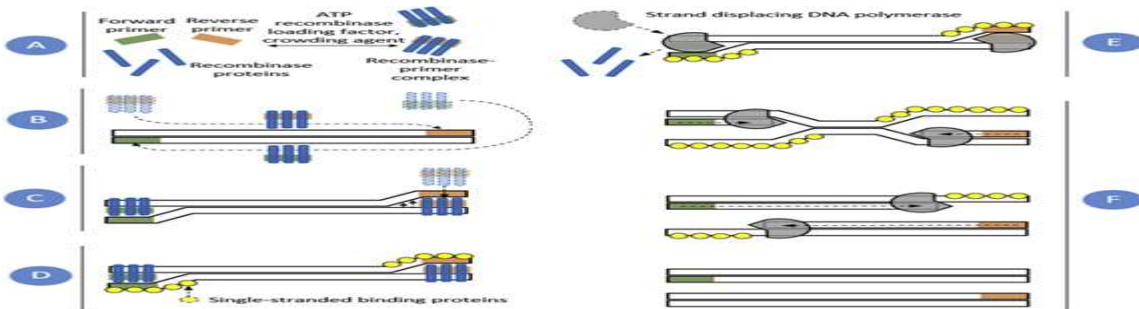


<그림> LAMP 프라이머를 이용한 ASFV의 농도와 온도에 따른 검출 결과

- 최적온도: 반응온도 57°C에서 66°C까지 1°C씩 단계별로 LAMP 반응을 수행한 결과 66°C 최적의 결과를 확인하였음
- 최소검출 한계: 10²에서부터 10⁹까지 10배씩 단계씩 희석하여 66°C에서 15분 반응하였을 때, 10⁹까지 15분내에 검출하였음

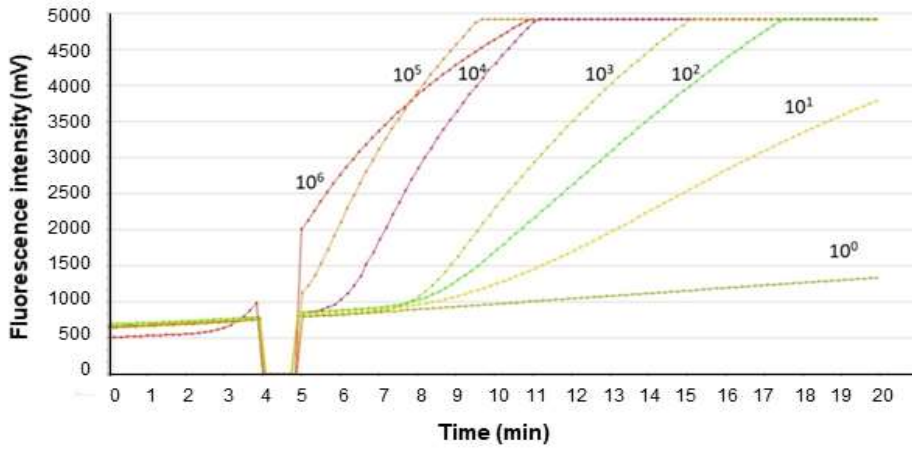
11) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) real-time RPA 신속 검사 키트 개발

(1) RPA (Recombinase polymerase amplification)의 신속한 ASFV 검출을 위한 적용



<그림> RPA의 원리 도해

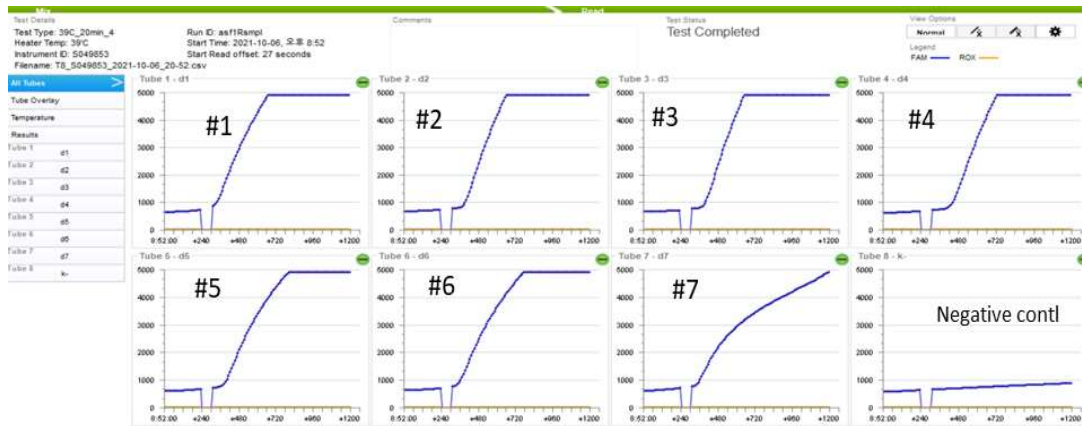
(2) ASFV real-time RPA 신속 검사 키트의 검출민감도

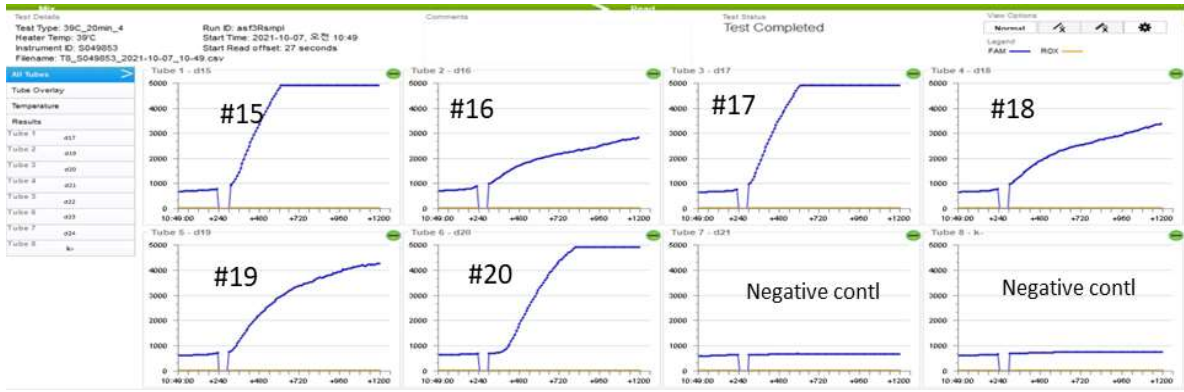


<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 검출민감도

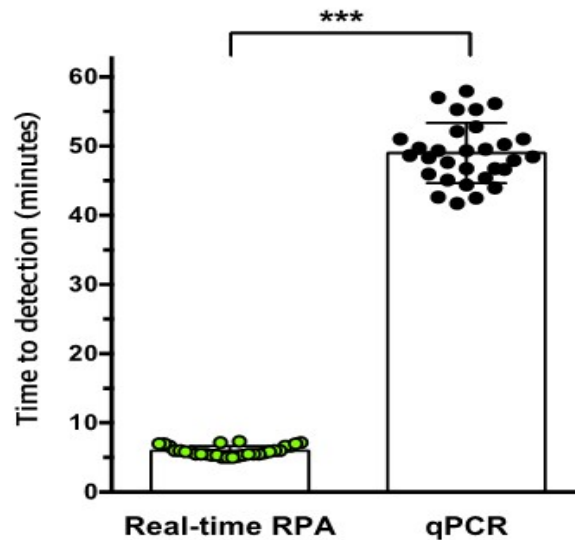
- 등온(39도)에서 20분간 반응
- FAM 형광채널을 통한 실시간 검출
- ASFV 10 copies까지 효율적으로 검출

(3) ASFV real-time RPA 신속 검사 키트의 임상검체를 통한 평가





<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 임상검체를 통한 유용성 평가결과

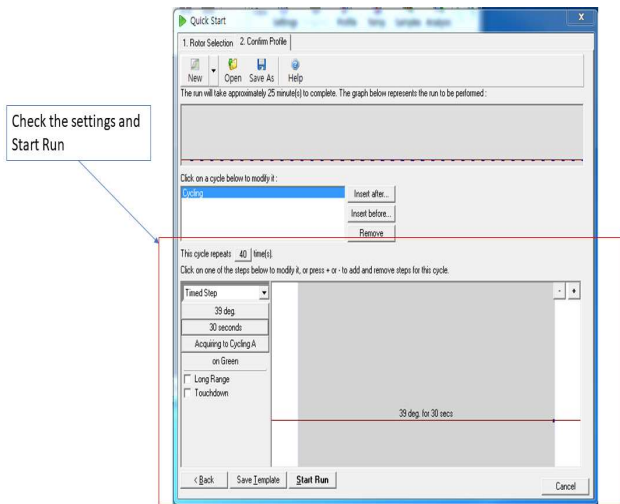
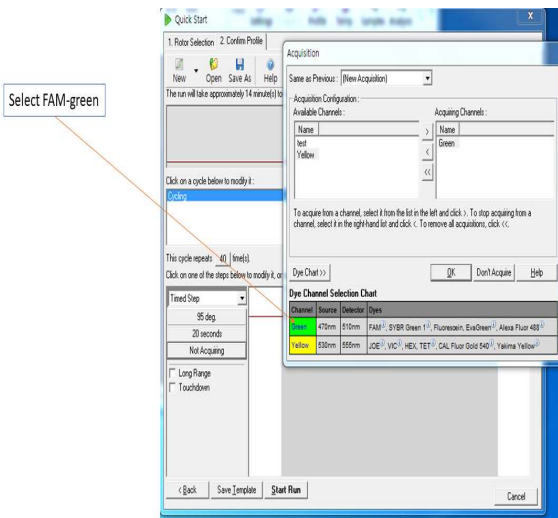
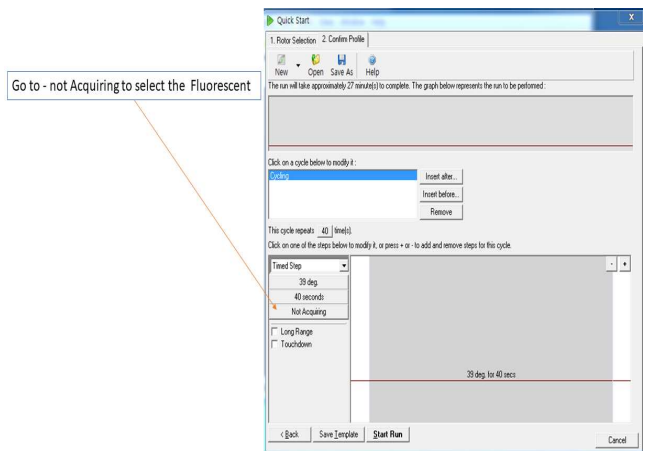
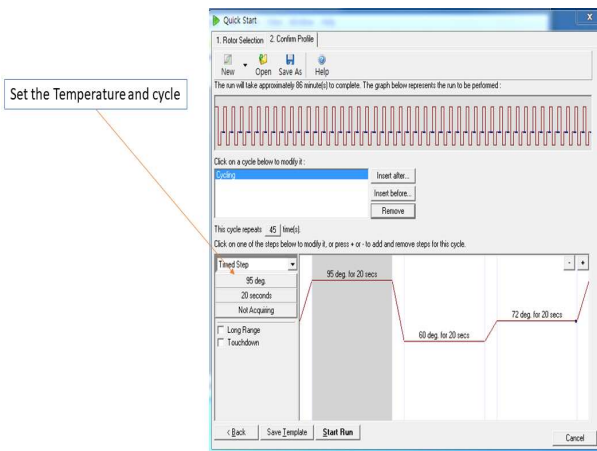
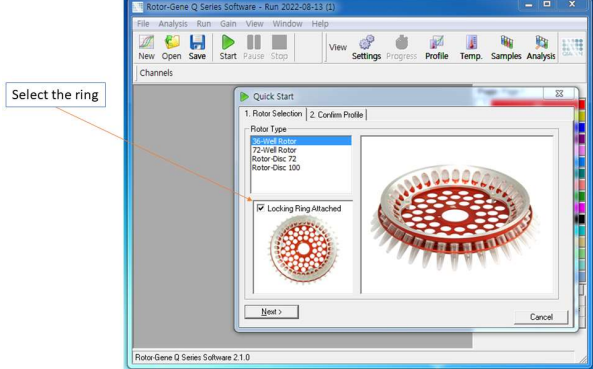
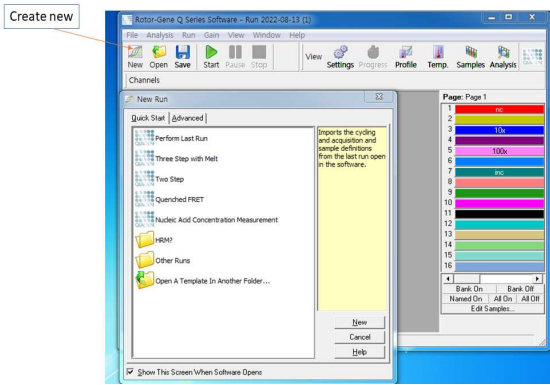


<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 일반 qPCR과의 검출시간 결과

(4) ASFV real-time RPA 신속검사키트의 기존 상용 real-time PCR 기기 적용

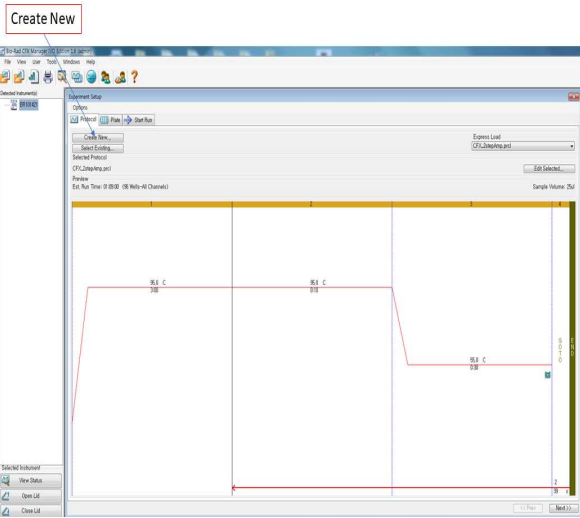
○ ASFV real-time RPA 신속검사키트의 Rotor gene Q (Thermo) 기기 적용

Set-up of RPA assay in Rotor gene Q

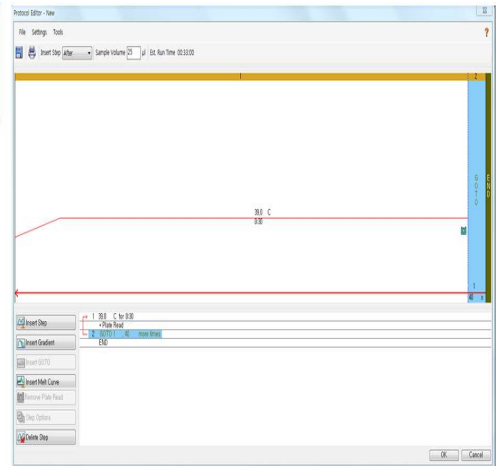


<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 Rotor gene Q (Thermo) 기기 설정 예

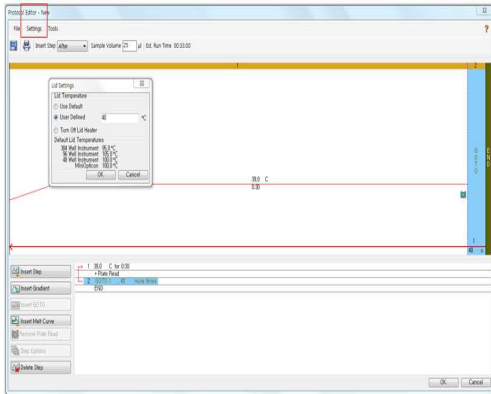
○ ASFV real-time RPA 신속검사키트의 CFX96 real-time PCR (BioRad) 기기 적용



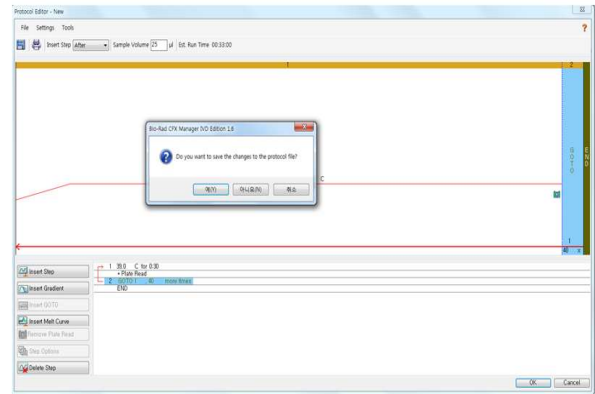
Set 1-at 39°C for 30 sec
2-add plate read,
3- set 40 cycles
Set the volume to 25ul



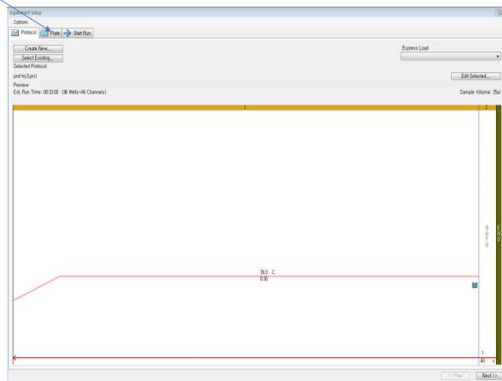
<Go to settings and Change the Lid temperature to 40°C>



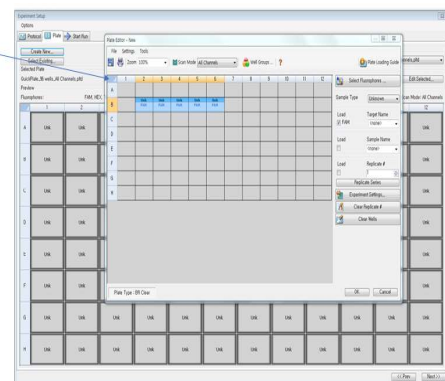
<Save the changes>



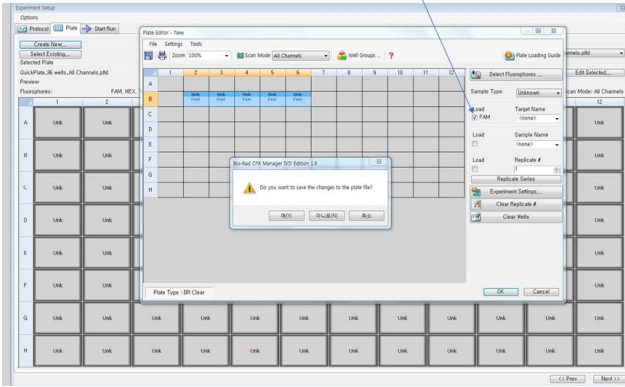
Go to Plate



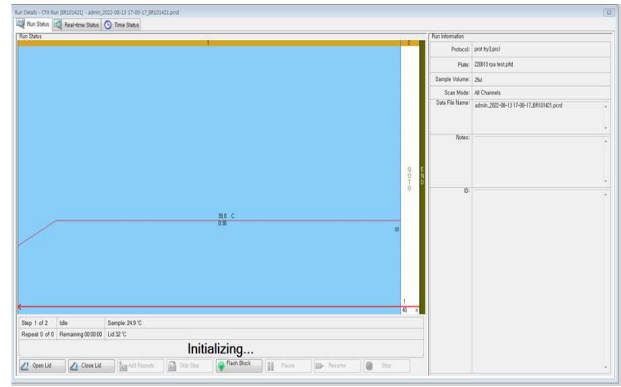
Create new plate



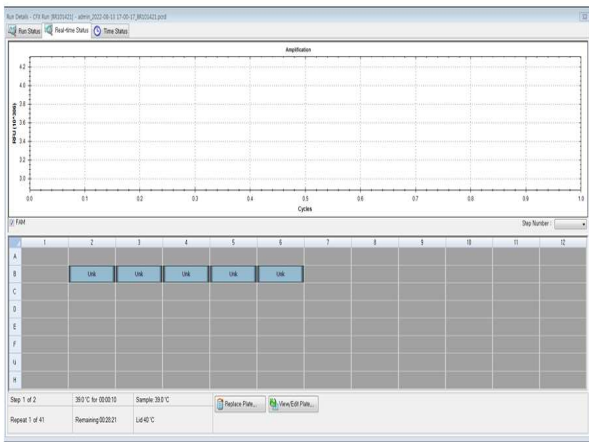
Select -FAM



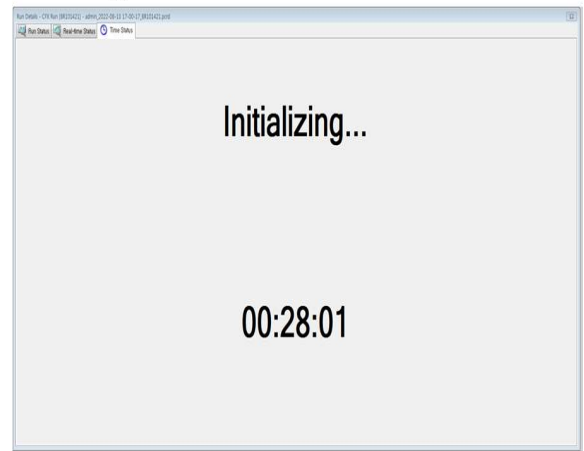
<Start Run>



<Running status>



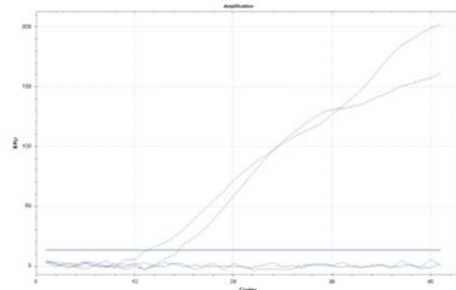
<Running time>



<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 CFX96 real-time PCR (BioRad)기기 설정 예

(5) ASFV real-time RPA 신속검사키트의 야외검체를 이용한 평가

Baseline Method:
FAM: Auto Calculated
Threshold Setting:
FAM: 13.43, User Defined

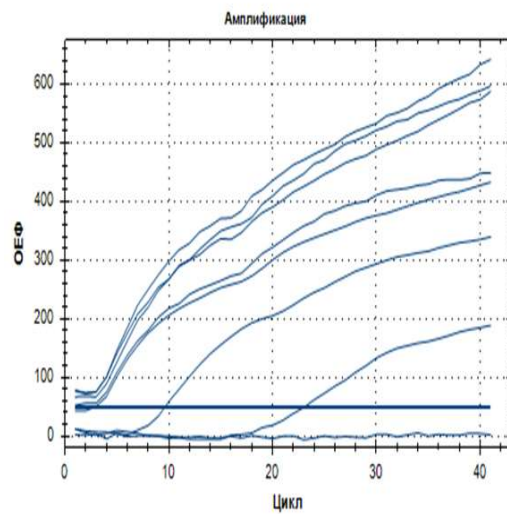


Quantification Data

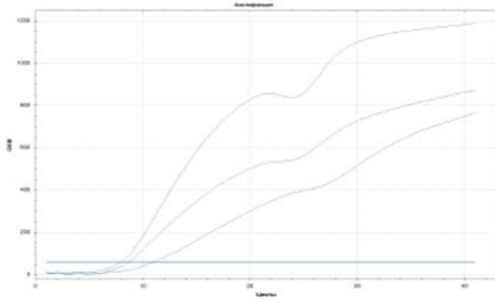
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
D03	FAM	Neg Ctrl	9	N/A	0,00	0,000	0,000
D04	FAM	Unkna	6	11,34	11,34	0,000	0,000
D05	FAM	Unkna	12	N/A	0,00	0,000	0,000
D06	FAM	Pos Ctrl	inc	14,47	14,47	0,000	0,000

Bar Chart

N16~34

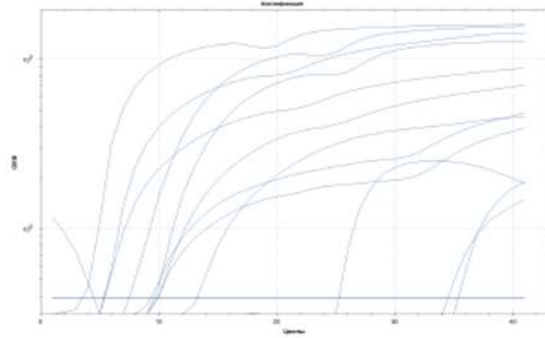


FAM: Рассчитать автоматически!
 Настройка порогового уровня для флуорофора:
 FAM: 60,02, Рассчитать автоматически!



Данные расчета

Пункт	Флуор.	Мишень	Содерж.	Проба	Cq	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
F05	FAM	ASFV	Неизвестно	4	10,94	10,94	0,000
F06	FAM	ASFV	Неизвестно	5	8,63	8,63	0,000
F07	FAM	ASFV	Неизвестно	5.1	7,96	7,96	0,000



Данные расчета

Пункт	Флуор.	Мишень	Содерж.	Проба	Cq	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
F03	FAM	ASFV	Неизвестно	1	25,44	25,44	0,000
F04	FAM	ASFV	Неизвестно	2	5,43	5,43	0,000
F05	FAM	ASFV	Неизвестно	3	5,41	5,41	0,000
F06	FAM	ASFV	Неизвестно	4	9,74	9,74	0,000

Данные расчета

Пункт	Флуор.	Мишень	Содерж.	Проба	Cq	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
F07	FAM	ASFV	Неизвестно	5	7,50	7,50	0,000
F08	FAM	ASFV	Неизвестно	6	3,50	3,50	0,000
F09	FAM	ASFV	Неизвестно	7	Н/О	0,00	0,000
F10	FAM	ASFV	Неизвестно	8	Н/О	0,00	0,000
G03	FAM	ASFV	Неизвестно	9	Н/О	0,00	0,000
G04	FAM	ASFV	Неизвестно	10	Н/О	0,00	0,000
G05	FAM	ASFV	Неизвестно	14	9,96	9,96	0,000
G06	FAM	ASFV	Неизвестно	15	9,28	9,28	0,000
G07	FAM	ASFV	Неизвестно	16	9,90	9,90	0,000
G08	FAM	ASFV	Неизвестно	17	35,53	35,53	0,000
G09	FAM	ASFV	Неизвестно	18	34,71	34,71	0,000
G10	FAM	ASFV	Положительный контроль	К+ PCR	13,21	13,21	0,000

<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 야외 검체를 이용한 평가(러시아 현지)

Отчет по тестированию тест-системы АЧС (производство Корея).

В качестве матрицы было использовано 4 образца от свиней (НК):

№ п/п	Наименование материала	Результат (заранее известный)
1	Сыворотка крови свиней	положительно (Ct=29,01)
2	Селезенка свиная (10% гомогенат)	отрицательно
3	Селезенка свиная (10% гомогенат)	отрицательно
4	Сыворотка крови свиней	отрицательно

Экстракция образцов ранее была проведена с помощью следующих наборов:
 Далее описание будет по приборам, на которых проводили анализ

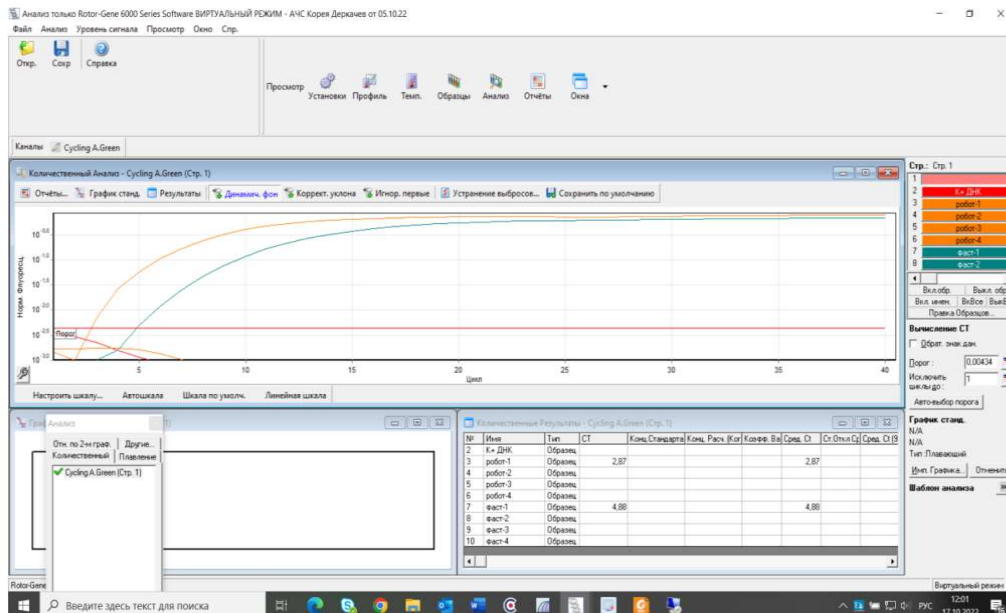


Рис. 1

1. Экстракция была проведена с помощью автоматической станции выделения (на рис 1-подписано робот на оранжевом фоне). Набор для экстракции использовался на основе магнитной сорбции.

Принцип действия

Биологический образец обрабатывается лизирующим раствором на основе гуанидина в присутствии частиц сорбента магнетизированного (магносорба). В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК/РНК. Растворенная ДНК/РНК в присутствии хаотропного агента связывается с частицами магносорба, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК/РНК к сорбенту происходит переход ДНК/РНК с поверхности сорбента в раствор,

2. Экстракция была проведена с помощью набора для экспресс-выделения (на рис 1 -на бирюзовом фоне).

Принцип метода.

Экспресс-методика основана на клеточном лизисе с последующей нейтрализацией ингибиторов. Экстракция ДНК из исследуемого образца занимает около 15 минут.

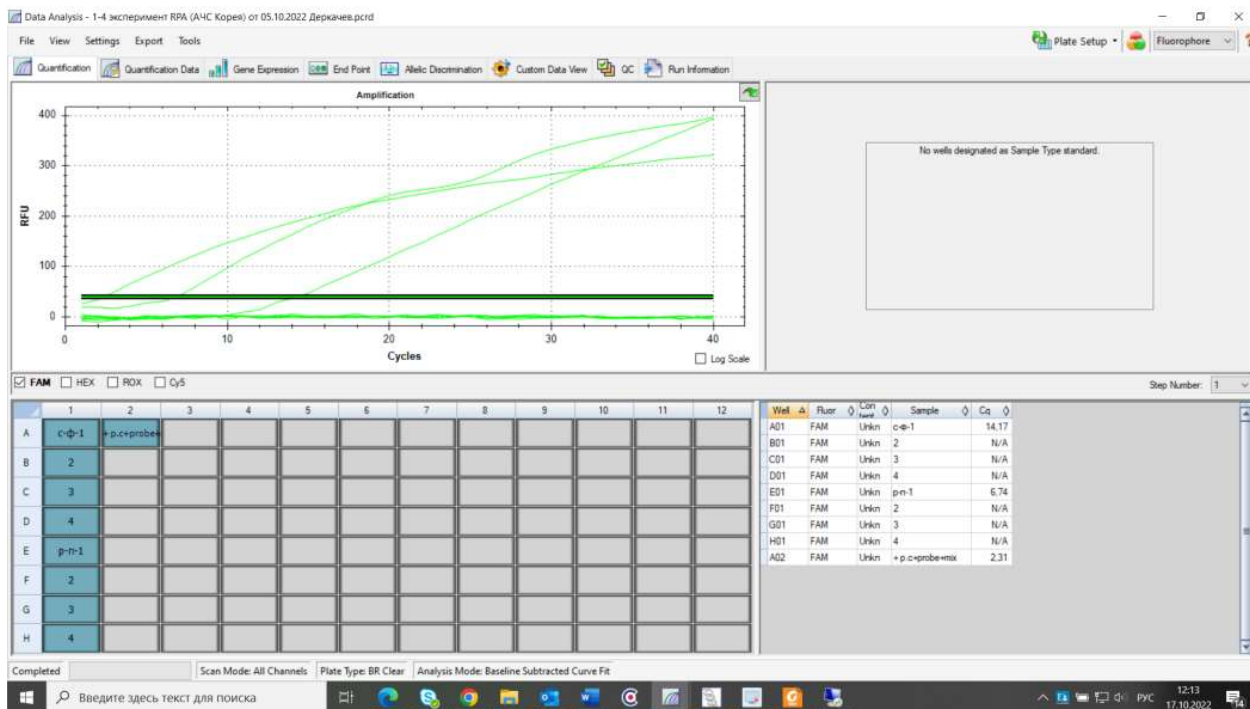


Рис 2.

который отделяется от частичек сорбента магнитной силой. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК/РНК, свободный от ингибиторов, что обеспечивает успешное проведение ПЦР.

3. Экстракция была проведена с помощью набора с сорбентом (на рис 2 образцы с-ф в ячейках А1-Д1 включительно).

Принцип действия.

Биологический образец обрабатывается лизирующим раствором на основе солей гуанидина. В результате происходит разрушение клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. ДНК в присутствии хаотропного агента связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизата остаются в растворе и удаляются после отмывки осажденного центрифугированием сорбента. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов ПЦР.

4. Экстракция была проведена с помощью набора, основанного на методе преципитации (на рис 2 образцы с-ф в ячейках Е1-Н1 включительно).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов «РИБО-преп» предназначен для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала для последующего анализа методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Комментарий по постановке на приборах:

Для тестирования были использованы 2 амплификатора : Rotor-Gene Q 6000 (Qiagen) и CFX96 (Bio-rad).

На приборе Rotor-Gene Q 6000 в пробирку не был добавлен 1 фермент (не совсем изначально поняли его назначение) , поэтому позитивный контроль не прошел.

На приборе CFX96 (Bio-rad) это устранили, в результате чего все прошло корректно.

Вывод:

Результаты во всех случаях совпали. Можно считать, что эксперимент удался.

Что касается продолжительности реакции – ввиду программирования приборов на 40 циклов реакция по продолжительности составил 32 минуты.

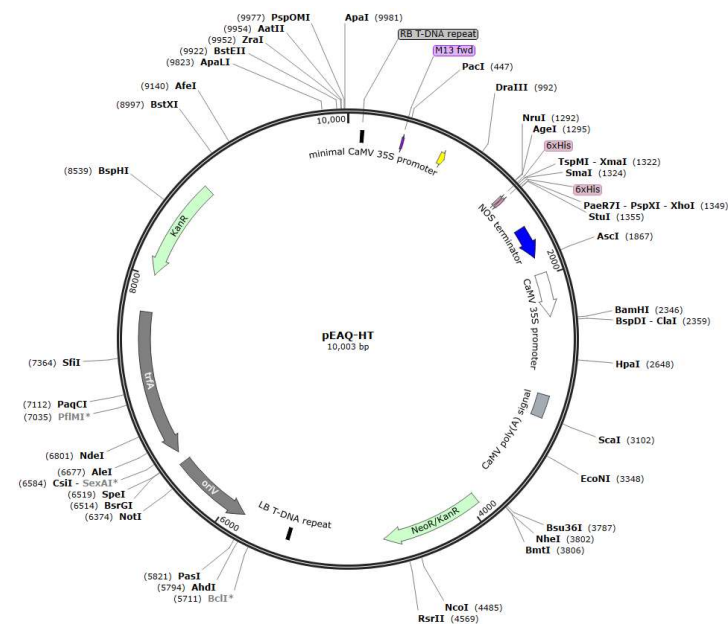
<그림> ASFV real-time RPA 신속검사키트의 러시아 현지 사용을 위한 프로토콜

12) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 유전체 분석 기반 식물 통한 아프리카돼지열병바이러스 융합단백질 발현

- 현재 다양한 고부가가치의 재조합 단백질들 (백신, 항체, 혹은 biopharmaceutics)을 식물기반 발현 시스템을 통해 생산하고 있는 연구들이 활발히 진행되고 있음
- 필립모리스인터내셔널(담배회사)이 투자한 캐나다 바이오제약회사인 Medicago는 식물기반 SARS-CoV-2 백신(코로나19 백신)을 발현생산연구 활발히 진행하여 현재 임상3상이 완료되었고, British American Tobacco(BAT)의 자회사인 Kentucky BioProcessing (KBP) 회사 담배 식물기반 코로나19 백신에 대한 임상이 완료되었음
- 본 연구 과제를 통해, P30과 CD2v를 transient plant expression system을 통해 P30과 CD2v가 발현 및 경제성분석을 통해 추후 활용될 수 있는 담배품종과 발현시스템을 평가하고자 함
- 아프리카돼지열병바이러스 P30과 CD2v를 활용하여 고부가가치의 항바이러스 백신 candidate swine fever virus monoclonal antigenic protein을 발현하여 그 효용성을 분석하고자 함

(1) Recombinant P30와 CD2v transient expression systems

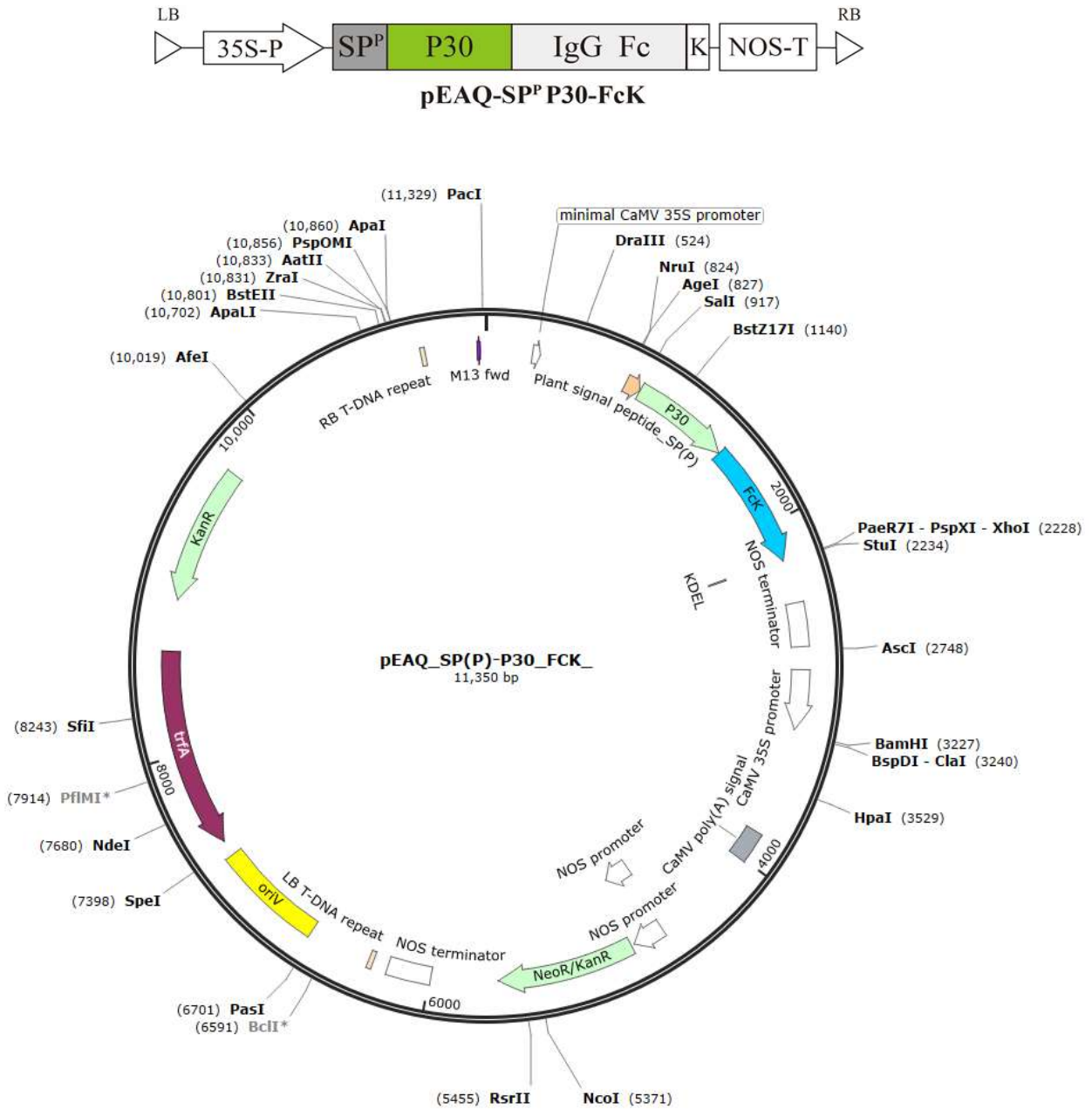
- Recombinant P30와 CD2v transient 발현 벡터를 이용하여 transient 담배발현시스템 확보하고자 함
- 기존에 많이 사용하는 pEAQ-HT 벡터의 경우, 오직 transient plant expression에만 상용화될 수 있는 벡터이기 때문에 transgenic expression system에 적용할 수 없음
- 본 연구에서는 *N. benthamiana* 품종에서 pEAQ-HT 벡터를 이용하여 recombinant P30와 CD2v Fc fusion protein의 발현수준을 표준으로 정하여 각 벡터의 발현량의 비교분석을 목표로 진행하였음



<그림> pEAQ-HT vector 도식 표현. 주요 기능이 표시되고 총 크기가 표시된 pEAQ-HT. 플라스미드 성장 또는 transient 발현에 필수적이지 않은 영역; 짙은 회색 화살표, 플라스미드 성장 및 복제에 필수적인 영역; 블랙박스, T-DNA 왼쪽(LB) 및 오른쪽(RB) 테두리 사이; 노란색 화살표, 프로모터 서열 (CaMV, Cauliflower mosaic virus); 파란색 화살표, 종결자 서열 terminator (nos, nopaline synthase). OriV, pRK2 복제 기점; ColEI, pBR322 복제 기점; NPT, neomycin phosphotransferase; TrfA, replication-essential locus.

(2) P30 발현벡터 pEAQ-SPPP30-FcK 식물 발현 벡터 구축

- P30 transient plant expression vector pEAQ-P30-FcK 벡터 구축을 위하여 PP30-FcK in pEAQ-HT 제작을 위해 (주) 바이오닉스에 gene synthesis와 cloning 의뢰하여 제작하였고, 식물 발현 최적화를 위하여 Nicotiana Tabacum Codon optimization을 (주) 바이오닉스에 의뢰하여 제작함.

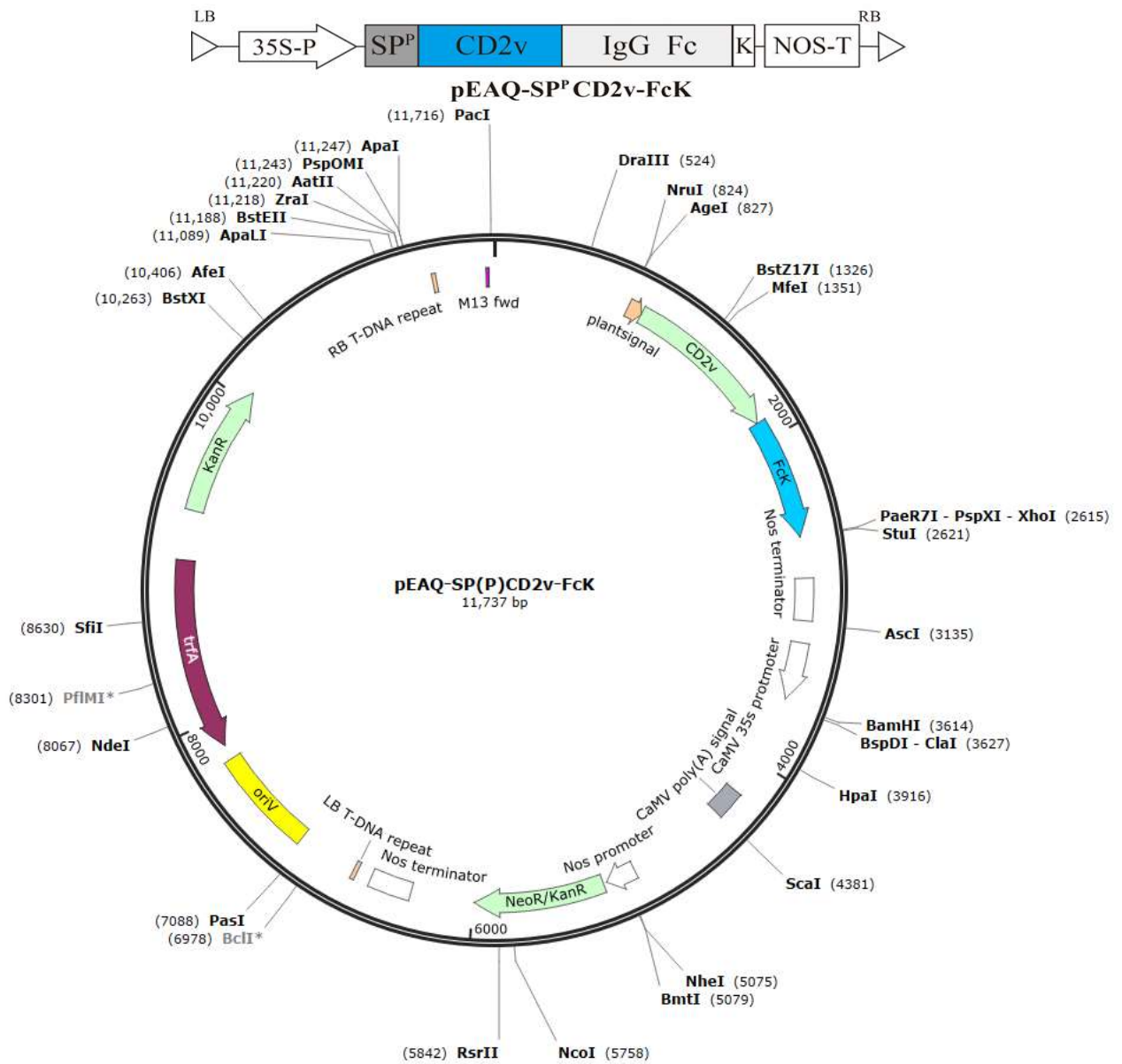


<그림> 제작된 pEAQ-SPPP30-FcK (35SP+NOST) vector. P30-FcK expression cassette를 포함하는 도식

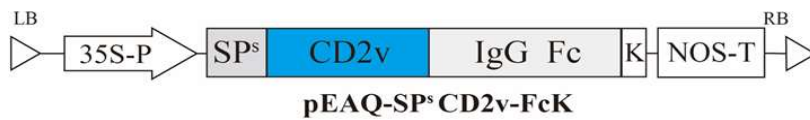
(3) pEAQ-SPPCD2v-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK 식물 발현 벡터 구축

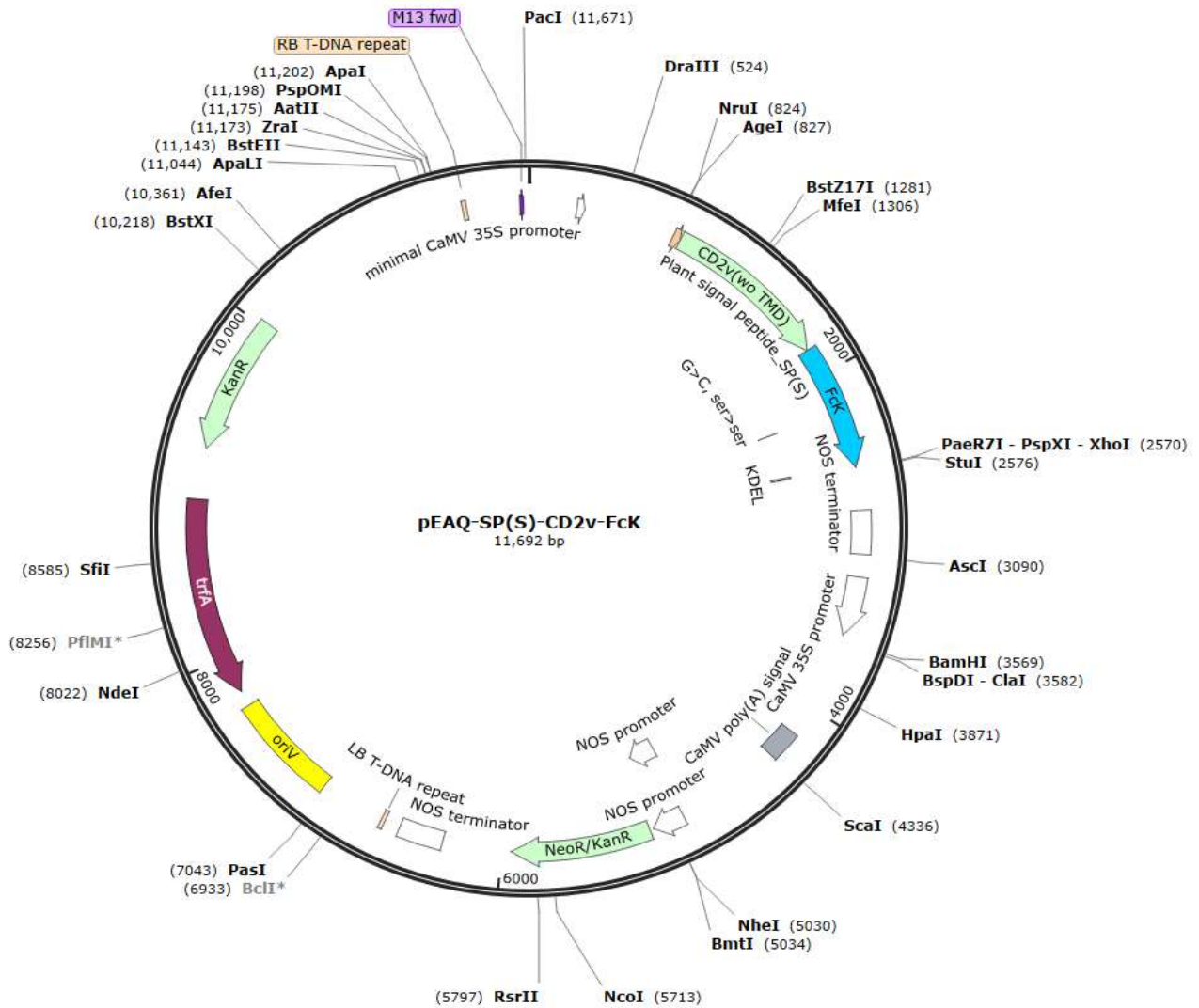
- CD2v-FcK transient plant expression vector pEAQ-HT 벡터 구축하기 위하여 CD2v 자체 내 존재하고 있는 signal peptide (SPs) 확인하였으며 plant signal peptide (SPP)와의 발현량 차이를 비교하기 위해 바이러스 및 식물유래 signal peptide를 CD2v N-terminus 앞에 fusion하여 발현벡터를 제작하였음.
- CD2v-FcK in pEAQ-HT 제작을 위해 (주) 바이오닉스에 gene synthesis와 cloning 의뢰하여 제

작하였고, 식물 발현 최적화를 위하여 *Nicotiana Tabacum* Codon optimization을 (주) 바이오닉스에 의뢰하여 제작함.



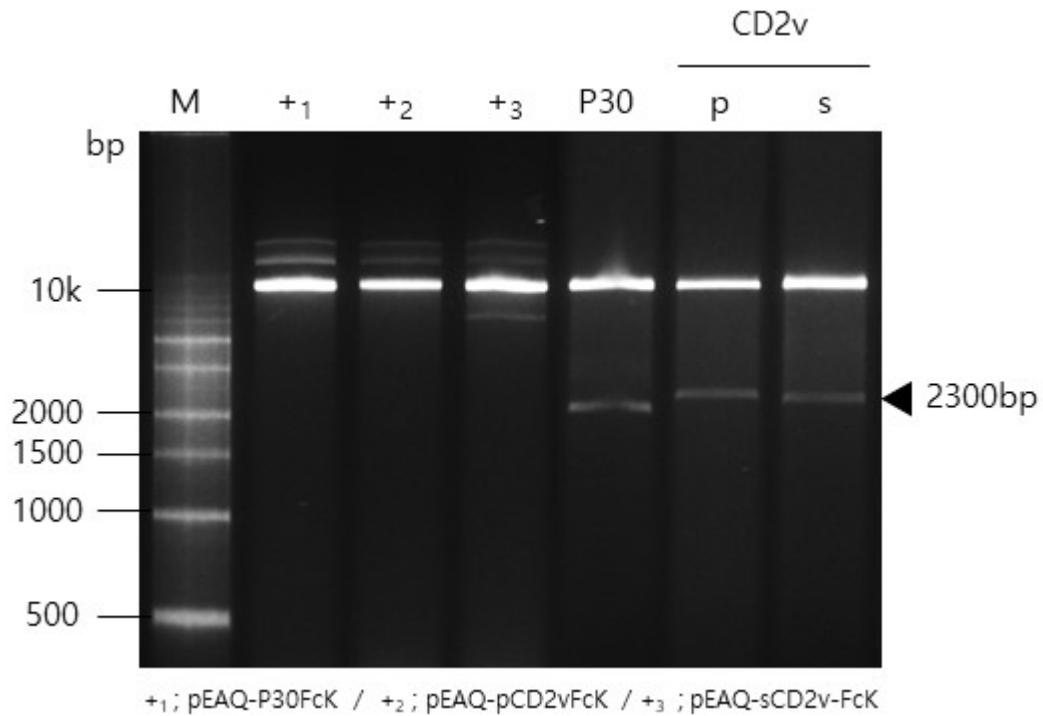
<그림> 제작한 pEAQ-SPPCD2v-FcK vector. SPPCD2v-FcK expression cassette를 포함하는 도식



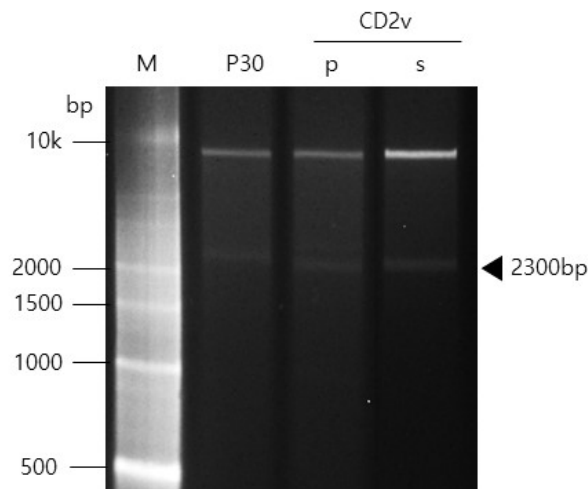


<그림> 제작한 pEAQ-SPsCD2v-FcK vector. SPsCD2v-FcK expression cassette를 포함하는 도식

- 구축된 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터 플라스미드를 Escherichia coli (DH5 α)로 Heatshock transformation을 통하여 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK E. coli 확보하였음
- E. coli 으로 형질전환이 완료 후 restriction enzyme digestion을 통해 형질전환 여부 확인하였음
- Agrobacterium infiltration 수행을 위해 E. coli에서 형질전환이 완료된 세 가지의 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK 그리고 pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터 플라스미드를 Agrobacterium tumefaciens LBA4404로 Electroporation 통해 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK 그리고 pEAQ-SPPCD2v-FcK 발현벡터를 포함하는 Agrobacterium 확보하였음
- Restriction Enzyme Digestion을 통해 형질전환 여부 확인.



<그림> Restriction Enzyme Digestion 통하여 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터를 갖는 *E. coli* confirmation



<그림> Restriction enzyme digestion 통하여 pEAQ-SPPP30-FcK pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터를 갖는 *Agrobacterium* confirmation

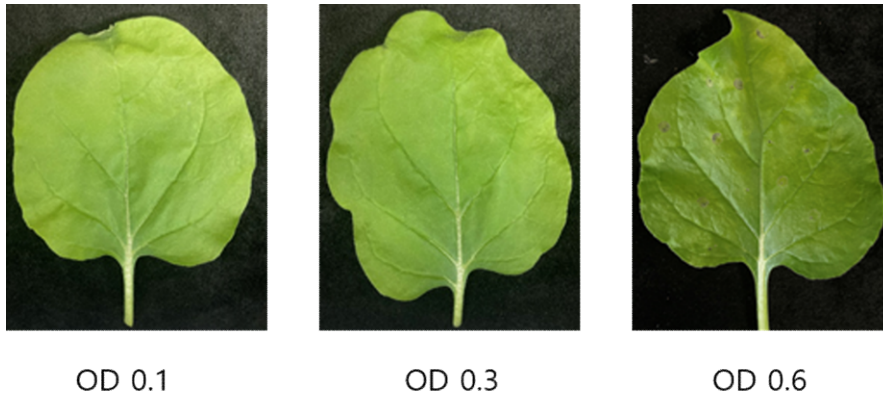
- pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터를 갖는 *E. coli*을 확보한 것을 Restriction Enzyme Digestion로 확인함.
- 유전자의 product band가 예상하고 있는 사이즈에 확인되었음. 이는 각각의 벡터가 *E. coli* 안에 존재함을 알 수 있음.
- *E. coli* transformation 이후 *Agrobacterium* infiltration을 위한 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터 안에 들어가 있는지 Restriction Enzyme Digestion로 확인함

(4) SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK Agro-infiltration

• 구축된 벡터의 최적화된 발현을 위한 OD값 설정하고 OD값 조건에 따른 Infiltration 진행 하였음

① *N. benthamiana* 식물을 이용하여 실험 진행

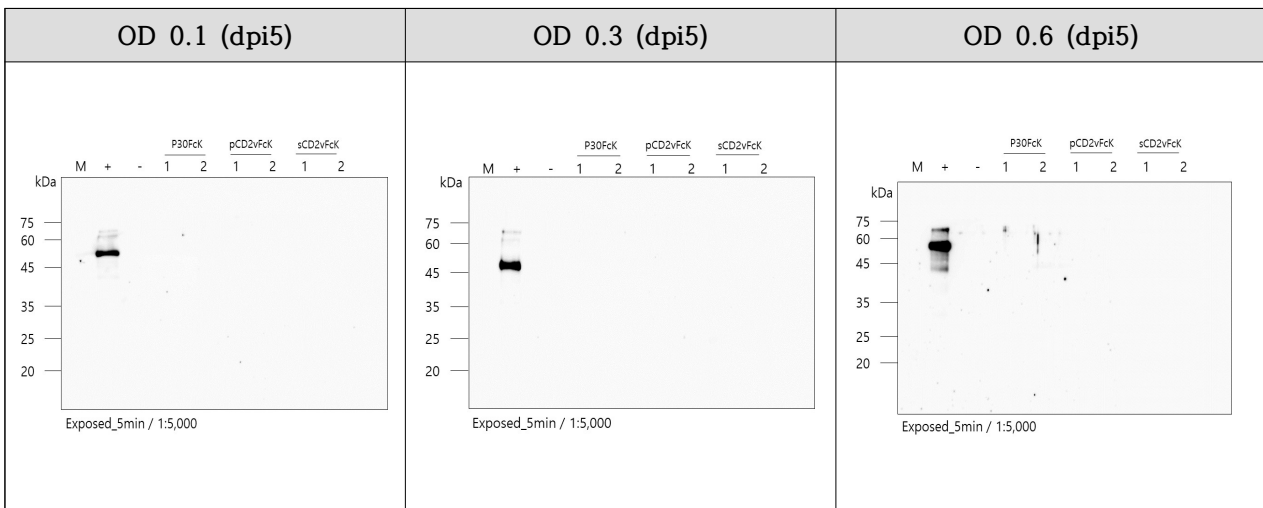
② 하나의 leaf에서 각 OD 0.1, 0.3 그리고 0.6 의 pEAQ-SP^P30-FcK, SP^SCD2v-FcK,



<그림> *N. benthamiana* 식물품종에서 pEAQ-SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK 벡터 OD값에 따른 최적화된 발현 조건 규명

(5) SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, 그리고 SPPCD2v-FcK Immunoblotting

• 구축된 벡터 SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, 그리고 SPPCD2v-FcK의 발현을 확인하기 위하여 OD 값 별 Immunoblotting 확인하였음



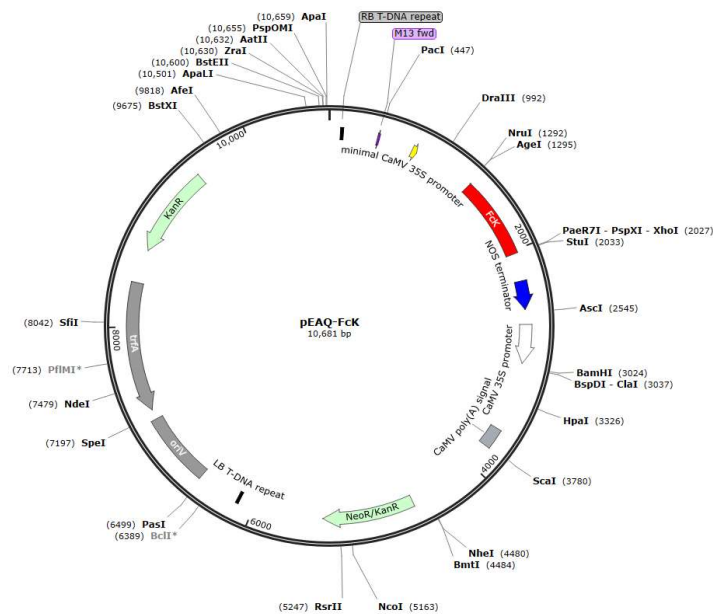
<그림> pEAQ-SPPP30FcK, SPpCD2vFcK, SPsCD2vFcK의 각 식물 개체에서 OD값에 따른 발현 비교 분석

• *N. benthamiana* 식물품종을 이용하여 다양한 OD값의 pEAQ-P30FcK, pEAQ-SPpCD2v, pEAQ-SPsCD2v를 infiltration하여 모두 동일하게 dpi(day post infiltration) 5에 harvest하여 immunoplotting으로 확인한 결과, OD 0.1, OD 0.3 OD 0.6 조건 모두에서 Positive control을 제외한 pEAQ-P30FcK, pEAQ-SPpCD2v, 그리고 pEAQ-SPsCD2v에서 어떠한 protein expression detection되지 않음.

- *N. tabacum*으로 codon optimization된 pEAQ-SPp P30FcK, pEAQ-SPpCD2v, 그리고 pEAQ-SPsCD2v을 *N. benthamiana* 식물품종에 OD값 별로 *Agrobacterium* infiltration하여 immunoblotting으로 확인하였으나 어떠한 발현도 확인할 수 없었음. 이는 codon optimization이 *N. tabacum*으로 되었기 때문이라 판단하여 다시 Codon optimization을 *N. benthamiana*로 다시 진행하였고, 인수받은 p30, CD2v를 pEAQ-FcK vector에 cloning 진행함.

(6) pEAQ-FcK를 P30, CD2v 발현벡터로 사용

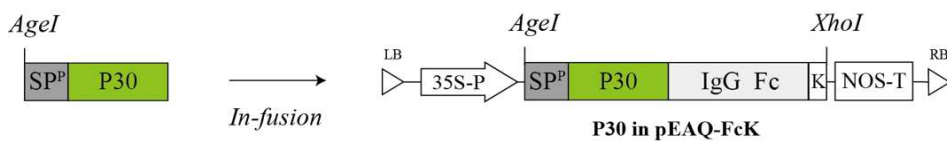
- pEAQ-HT 벡터 내에 FcK 존재. 오직 transient plant expression에만 상용화될 수 있는 벡터이기 때문에 transgenic expression system에 적용할 수는 없기 때문에 pEAQ-FcK 벡터를 P30과 CD2v 발현벡터로 사용함

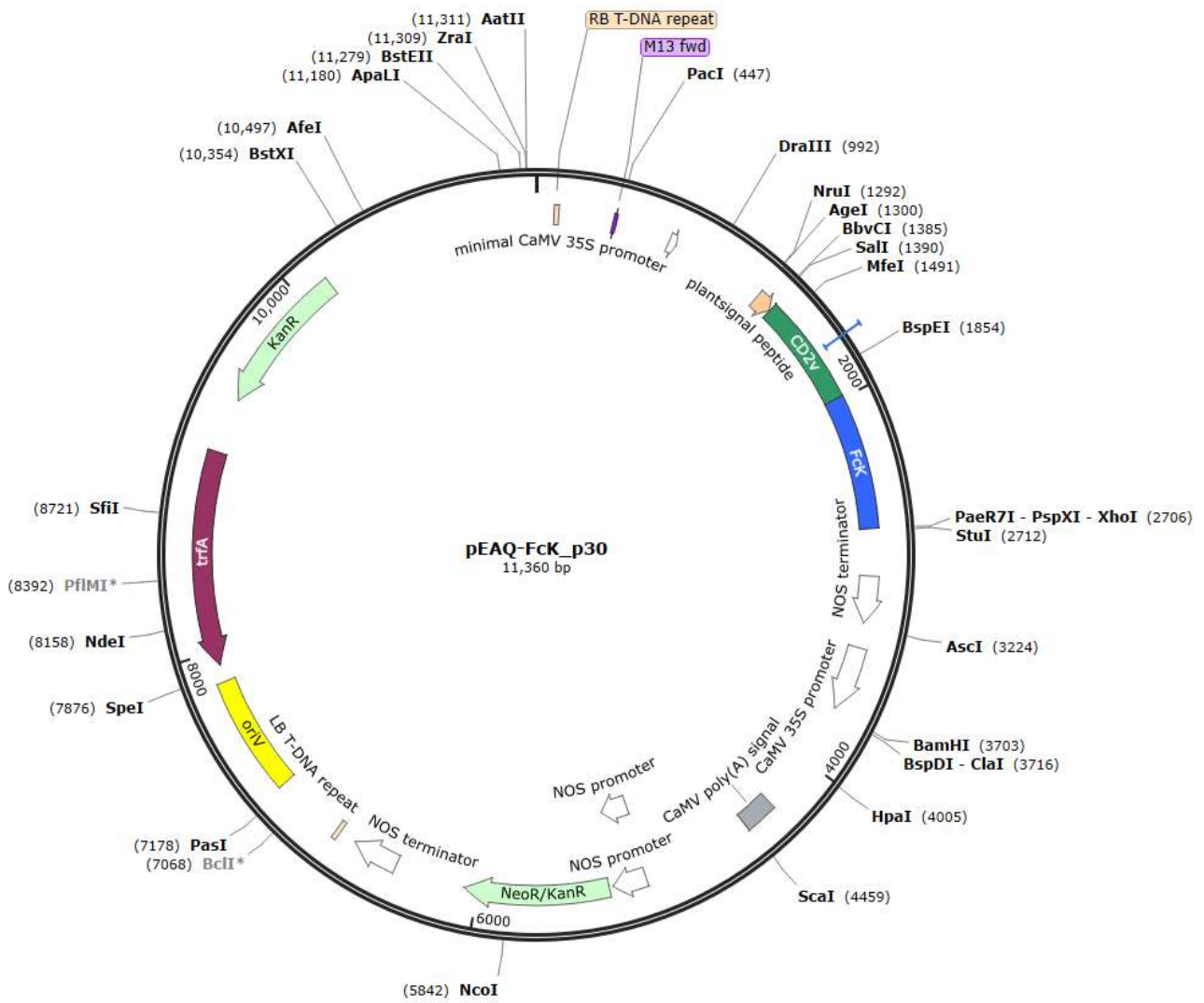


<그림> pEAQ-FcK vector 도식 표현. 주요 기능이 표시되고 총 크기가 표시된 pEAQ-HT. 플라스미드 성장 또는 transient 발현에 필수적이지 않은 영역; 짙은 회색 화살표, 플라스미드 성장 및 복제에 필수적인 영역; 블랙박스, T-DNA 왼쪽(LB) 및 오른쪽(RB) 테두리 사이; 노란색 화살표, 프로모터 서열 (CaMV, Cauliflower mosaic virus); 파란색 화살표, 종결자 서열 terminator (nos, nopaline synthase). Human IgG Fc, KDEL(endoplasmic reticulum sequence); 빨간색 박스, OriV, pRK2 복제 기점; CoIE1, pBR322 복제 기점; NPT, neomycin phosphotransferase; TrfA, replication-essential locus.

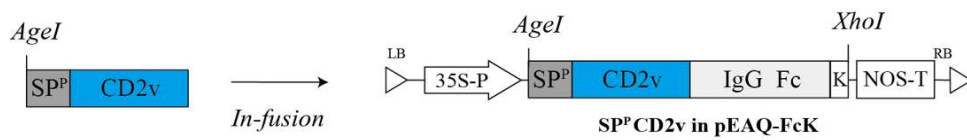
(7) pEAQ-SPPP30FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK, 그리고 pEAQ-SPsCD2v-FcK 식물 발현 벡터 구축

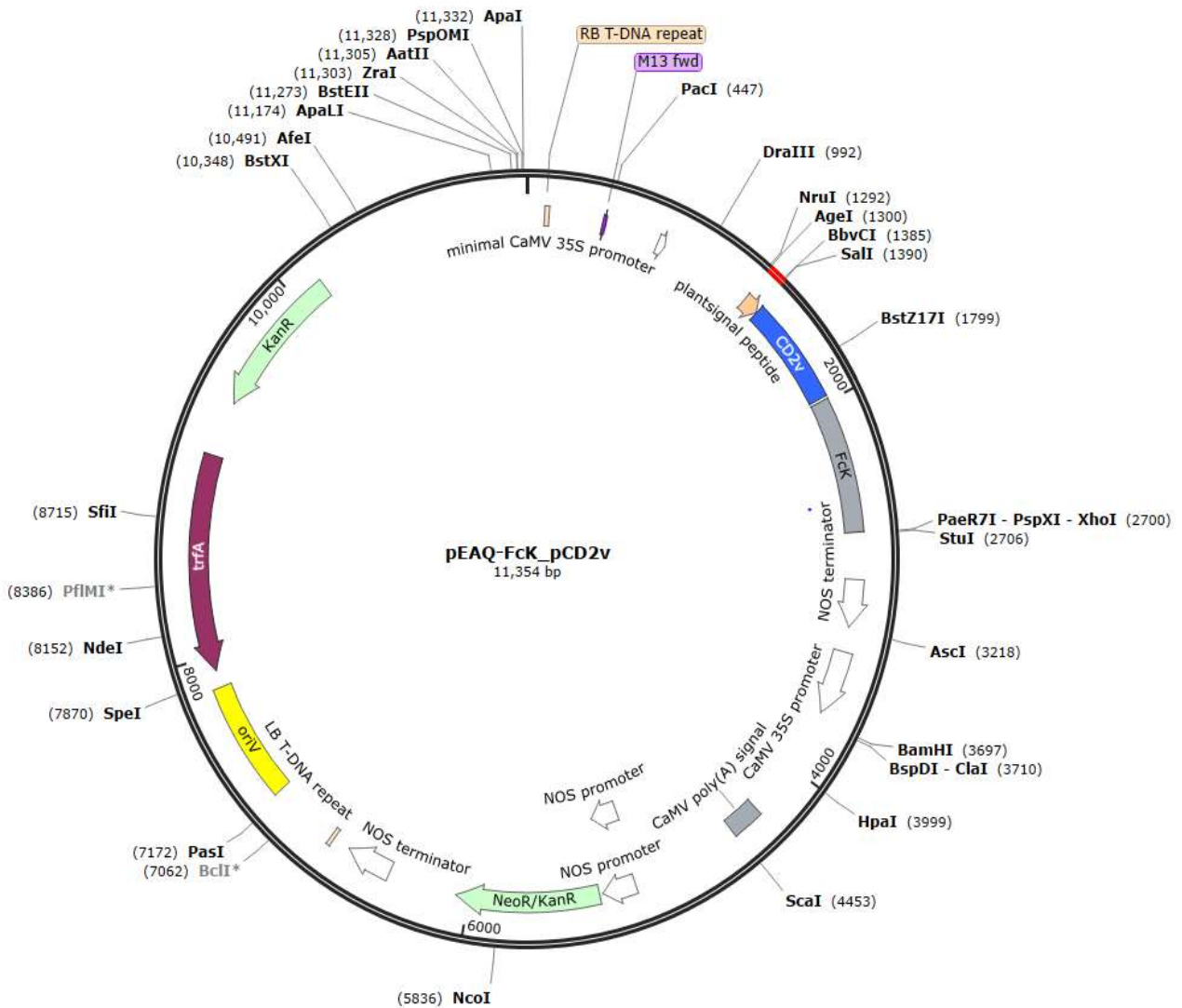
- P30와 CD2v in pEAQ-FcK cloning을 위하여 In-fusion cloning 방법으로 Insert 삽입. 최종적으로, pEAQ-SPPP30FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK, 그리고 pEAQ-SPsCD2v-FcK 구축 완료함





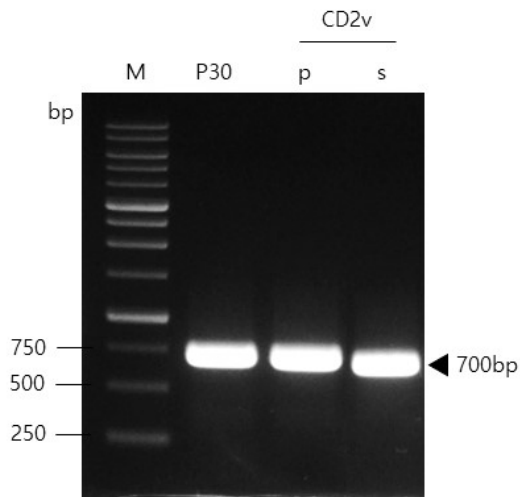
<그림> 제작한 pEAQ-SP^PP30FcK, vector. SP^PP30FcK expression cassette를 포함하는 도식





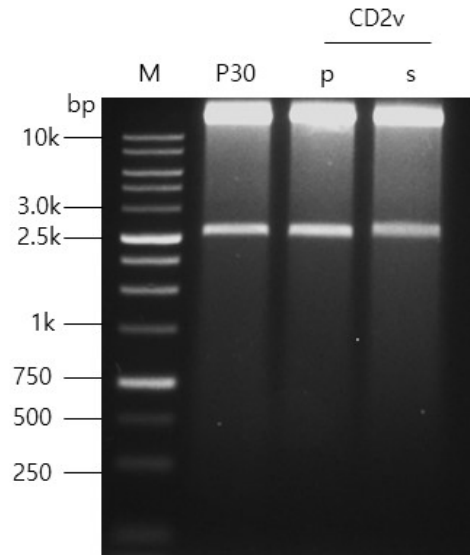
<그림> 제작한 pEAQ-SPPCD2v-FcK vector. SPPCD2v-FcK expression cassette를 포함하는 도식

- 구축된 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터 플라스미드를 PCR 분석을 통해 pEAQ-FcK 벡터에 P30와 CD2v의 insertion 확인하였음



<그림> PCR 분석을 통하여 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK pEAQ-FcK vector에 P30와 CD2v의 insertion (약700bp) 확인

- Agrobacterium infiltration 수행을 위해 세 가지의 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK 그리고 pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터 플라스미드를 Agrobacterium tumefaciens (LBA4404)로 Electroporation 통해 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK 그리고 pEAQ-SPPCD2v-FcK 발현 벡터를 포함하는 Agrobacterium 확보함



<그림> Restriction enzyme digestion 통하여 pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터를 갖는 Agrobacterium confirmation

- pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK 벡터를 갖는 Agrobacterium을 확보한 것을 Restriction Enzyme Digestion로 확인함.
- 유전자의 product band가 예상하고 있는 사이즈에 확인되었음. 이는 각각의 벡터가 Agrobacterium 안에 존재함을 확인함.

(8) pEAQ-SPPP30-FcK, pEAQ-SPsCD2v-FcK, pEAQ-SPPCD2v-FcK Agro-infiltration

- 구축된 벡터의 최적화된 발현을 위한 OD값 설정하기 위하여 OD값 조건에 따른 Infiltration 진행하였음

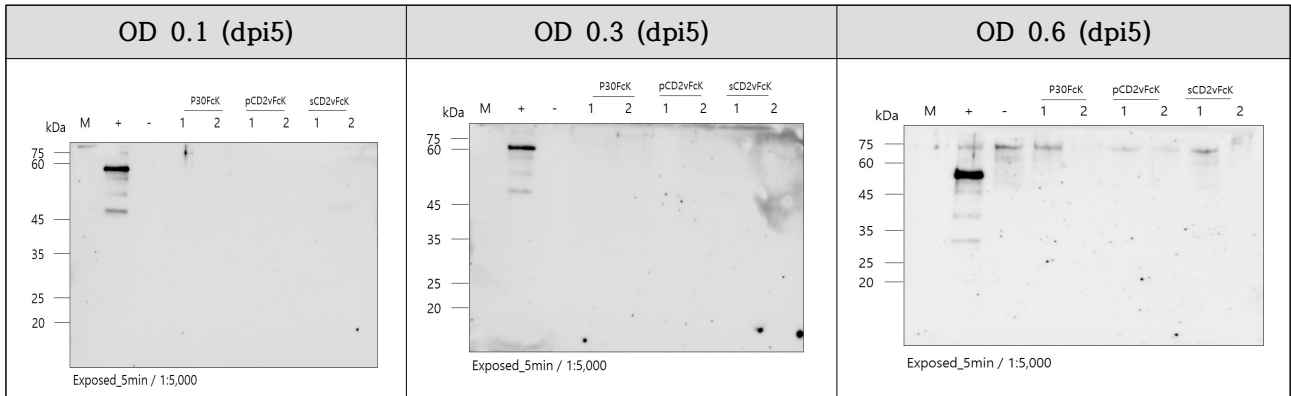


<그림> N. benthamiana 식물품종에서 pEAQ-SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK 벡터 OD값에 따른 최적화된 발현 조건

- *N. benthamiana* day 식물을 이용하여 실험 진행
- 하나의 leaf에서 각 OD 0.1, 0.3 그리고 0.6 의 pEAQ-SPPP30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK infiltration을 진행.

(9) P30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK Immunoblotting

- 구축된 벡터 P30-FcK, SPsCD2v-FcK, SPPCD2v-FcK의 발현 확인을 위하여 OD값 별로 immunoblotting 확인하였음



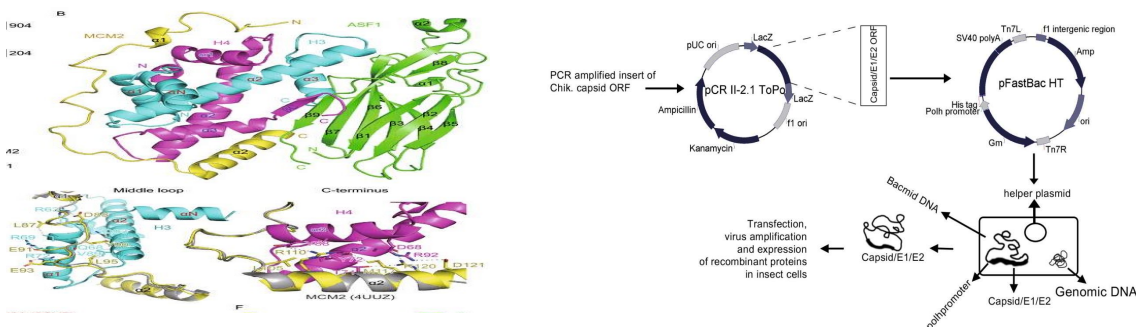
<그림> pEAQ-SPpP30FcK, SPpCD2vFcK, SPsCD2vFcK의 각 식물 개체에서 OD값에 따른 발현 비교 분석

- *N. benthamiana* 식물품종을 이용하여 다양한 OD값의 pEAQ-P30FcK, pEAQ-SPpCD2v, pEAQ-SPsCD2v를 infiltration하여 모두 동일하게 dpi(day post infiltration) 5에 harvest하여 immunoblotting으로 확인한 결과, OD 0.1, 0.3 그리고 0.6 조건 모두에서 Positive control을 제외한 pEAQ-SPpP30FcK, pEAQ-SPpCD2v, pEAQ-SPsCD2v에서 어떠한 product도 detection 되지 않아 western blot을 anti-IgG Fc로 수행하였기에, 가능하면 추가적으로 anti-P30 IgG와 anti-CD2v IgG로 western blot을 확인할 필요가 있음.
- 또한, protein 발현이 되지 않은 원인 및 발현을 잘 되게 하기 위하여 추가적으로 RT-PCR을 수행하는 것이 필요하며, transcription, translation, 혹은 post-translation 과정에서 단백질 발현의 차이점들을 보일 수 있기 때문에, 이러한 확인 연구가 필요할 것으로 보임.

13) ASFV 재조합 단백질 제작

(1) ASFV 단백질 재조합 발현

- 아프리카돼지열병바이러스 다양한 유전자 중 면역원성이 높아 진단적 및 백신으로서의 가치가 높은 항원을 대장균 발현시스템을 이용하여 발현함



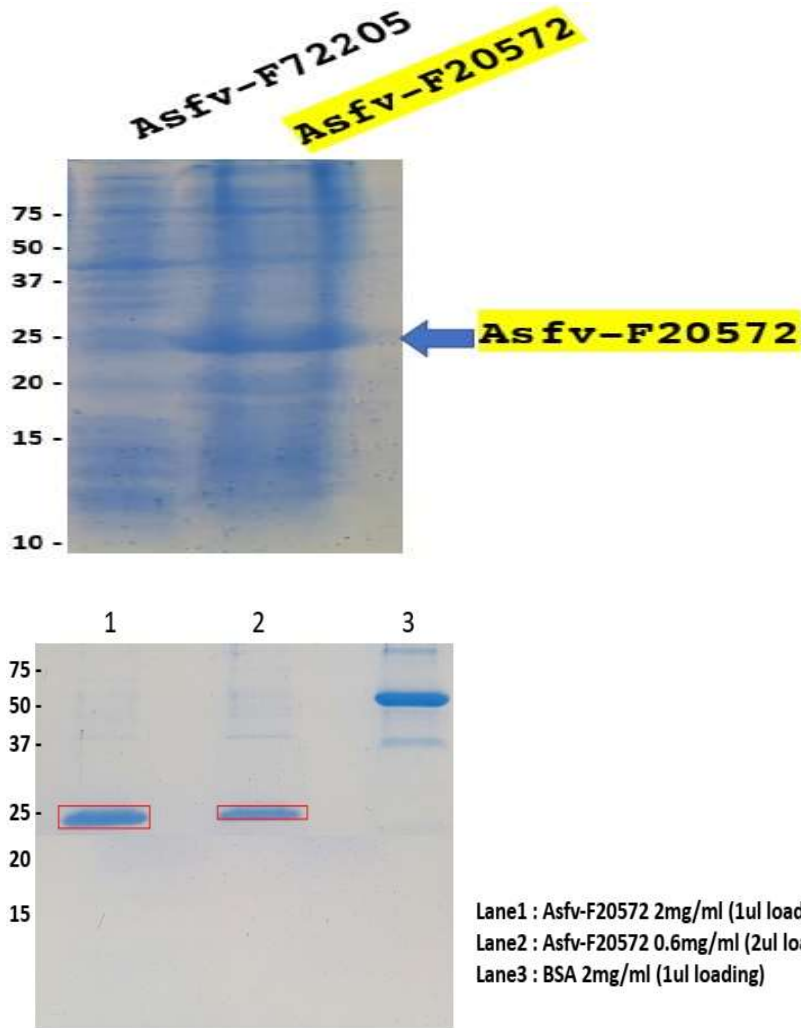
<그림> 아프리카돼지열병바이러스 단백질 발현 시스템

- ASFV 내의 천연형 단백질과 비교하여 ASFV 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐 아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있고, 산업적으로도 생산성이 높은 것으로 확인된 p205 폴리펩타이드 단편과 p72 폴리펩타이드 단편을 서로 융합한 경우, 그 천연형 단백질 및 각각의 폴리펩타이드 단편과 비교하여 상기의 효과가 월등히 높을 것으로 생각되어 제작함

<표> ASFV p205의 아미노산 서열 비교

pep. fragment 명칭	서열정보
Italia-asfv-p205	VEPREQFFQDLLSAVDQQMDTVKNDIKDIMKEKTSFMVSFENFIERYDTMEKNIQDLQNKYEEMAANLMTVMTDTKIQLGAIIAQLEILMINGTPLPAKTTIKEAMPLPSSNTNNDQTSPASGKTSETPKKNPTNAMFFTRSEWASSKTFREKFLTPEIQAAILDEQFANKTGIERLHAEGLYMWRTQFSDEQKMKVEMMKK
Italia-asfv-pep205-1	VEPREQFFQDLLSAVDQQMDTVKNDIKDIMKEKTSFMVSFENFIERYDTMEKNIQDLQNKYEEMAANLMTVMTDTKIQLGAIIAQLEILMINGTPLPAKTTIKEAMPLPSSNTNNDQTS
Italia-asfv-pep205-2	VEPREQFFQDLLSAVDQQMDTVKNDIKDIMKEKTSFMVSFENFIERYDTMEKNIQDLQNKYEEMAANLMTVMTDTKIQLGAIIAQLEILMINGTPLPAKTTIKEAMPLPSSNTNNDQTSPASGKTSETPKKNPTNAMFFTRSEWASSKTFREKFLTPEIQAAILDEQFANKTGIERLHAEG

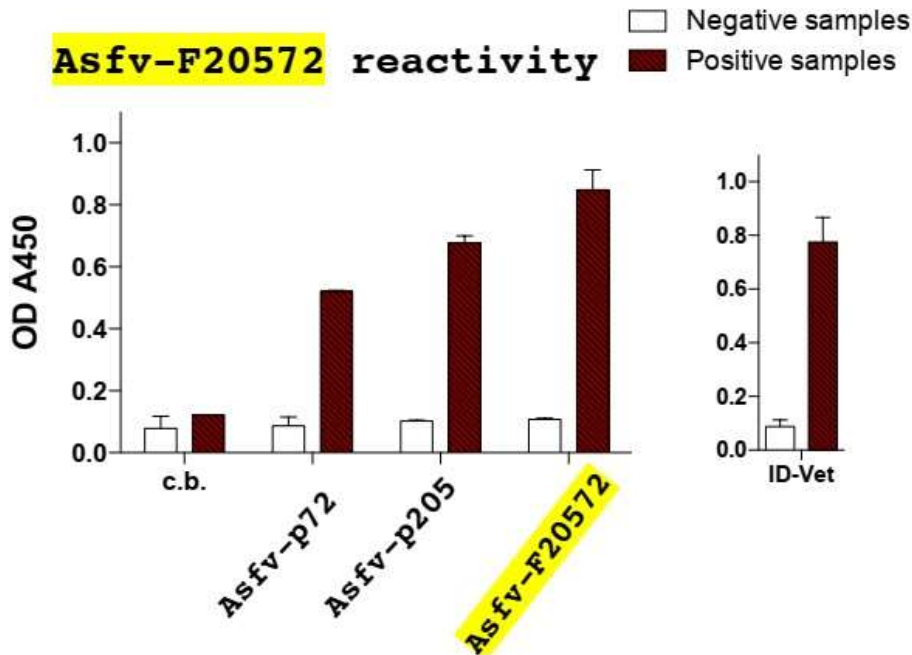
- ASFV 폴리펩타이드들은 Escherichia coli 균주인 BL21 균주에서 과발현시켰음. 벡터로 형질전환된 E. coli 세포들을 100 ug/ml kanamycin이 포함된 Luria-Bertani (LB) 배지를 이용하여 37°C에서 OD600이 0.7 이 될 때까지 성장시켰고, 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)에 의해 단백질 발현이 유도되었음.
- IPTG를 넣은 후, 추가로 4시간 동안 배양한 다음, 5,000 rpm에서 20분 간 원심 분리하여 세포를 회수하였고, 회수된 세포를 50 ml의 IB buffer (pH 8.0 Tris 0.1 M, pH 8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 5 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 mM)에 재현탁시킨 후, 초음파 처리로 세포를 깨주고 최종적으로 Denaturation buffer (6 M Guanidine Hydrochloric acid, pH 8.0 Tris 0.1 M 및 pH 8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 2.5 mM 조성의 Denaturation buffer를 사용)에 재현탁 시키고, 초음파 처리로 세포를 깨주었음
- 원심분리하여, Snake skin tube에 상층액을 넣어주고 20 mM HEPES pH 7.4 150 mM NaCl buffer 에 4°C 14시간 넣어 준다. 이것을 다시 5,000 rpm으로 20분 동안 원심분리시킨 후, 상층액을 Ni-NTA에 처리하여 1시간 30분 동안 4°C에서 결합시킴. 50 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 washing 해준 후, 250 mM Imidazole 및 500 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 용출시킴.
- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용해 폴리펩타이드를 확인하였으며, 폴리펩타이드들은 pH 7.4 HEPES 20 mM 및 Sodium chloride 150 mM를 포함하는 버퍼에 수용되었음 (4°C, overnight).
- 재조합 대장균 세포주에서 본 발명의 폴리펩타이드인 Asfv-F20572 단백질의 발현량을 p72-p205의 순서로 동일한 연결서열(-GAGGS-)과 융합한 단백질(Asfv-F72205)과 비교한 결과 Asfv-F20572 단백질의 정제하였음



<그림> ASFV F20572의 발현과 정제 결과

(2) ASFV 재조합단백질의 혈청진단적 유용성 평가

- ID.vet 社の ID Screen® African Swine Fever Indirect Screening test kit를 이용하여, 제작한 단편 폴리펩타이드의 ASFV 감염 혈청내 항체와의 결합능력을 ID(indirect)-ELISA 방법으로 비교 평가함
- 먼저 96 Well EIA/RIA plate에 Coating buffer (0.015 M Sodium carbonate, 0.035 M Sodium bicarbonate, Final pH 9.6)와 각각의 항원(실시에 2-1에서 제작한 단편 폴리펩타이드 각각, 2 ug/ml 또는 4 ug/ml 농도로 첨가)을 첨가하고 4℃에서 overnight (16h) 으로 인큐베이션 하여, 각각의 항원으로 well을 코팅함
- 200 ul의 PBST buffer (1XPBS + Tween20 0.05%)를 사용하여 각 well을 4번씩 세척하여 주었고, 각 well에 1차 항체를 100 ul씩 첨가 후, 실온(22℃)에서 1시간 인큐베이션함.
- 1차 항체는 ID.vet 社の African Swine Fever Indirect Screening test kit 내에서 positive control로서 제공되는 ASFV 감염 돼지 혈청 형태로 처리하고, 그 후 PBST buffer 200 ul로 각 well을 세척한 후, 각 well에 2차 항체를 100 ul씩 첨가고 실온에서 1시간 인큐베이션 해주었음
- 각 well에 Substrate solution 100 ul씩 첨가 후, 빛을 차단시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션 해주고, 각 well에 Stop solution 100 ul 씩 첨가하고, 450 nm 에서 흡광도 (Optical Density) 값을 측정함.



<그림> ASFV 재조합 단백질의 혈청진단적 평가

- Asfv-F20572 (서열번호 1)의 단편 폴리펩타이드는 다른 아프리카 돼지 열병 항원 단백질 (Asfv-p72 또는 Asfv-p205)과 비교하였을 때 월등한 수준으로 ASFV 감염 혈청에 대해서 높은 선택적 반응성을 나타내었음.
- 또한 ID.vet社에서 제공하는 상업용 진단시약과 비교하여도 뛰어난 반응성을 나타내었음.

(3) ASFV 재조합단백질을 이용한 ELISA 키트의 혈청진단적 유용성 평가

○ ASF Ab ELISA의 구성

- ELISA Plate
 - Antigen: P72, K205R, F20572 재조합 단백질
 - Immunoplate: Antigen의 높은 부착력을 위해 표면에 특수처리가 된 상용화 제품
 - Coating Buffer: 0.05M carbonate-bicarbonate, pH9.6
 - Blocking Buffer: 1%BSA/PBS
- Reagent
 - Dilution Buffer: PBS
 - Detection Antibody(Ab): Goat Anti-Pig IgG H&L horseradish peroxidase (HRP)
 - Washing Buffer: 0.05%Tween/PBS
 - Substrate: Tetramethylbenzidine(TMB)
 - Stop solution: 0.5M Sulfuric acid
- ASF Ab ELISA 제작
 - 재조합 단백질을 0.05M carbonate-bicarbonate buffer와 혼합 후, immunoplate에 분주하여 냉장(4℃)에서 24 시간동안 반응
 - 24시간 반응 후, 1% BSA/PBS를 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응
 - 반응이 끝나면, immunoplate 내의 시약을 제거 하고 0.05%Tween/PBS로 3회 세척

- 재조합 단백질이 부착된 immunoplate는 제습제와 함께 밀봉하여 냉장(4℃) 보관
 - 각각의 reagent는 상용화 제품을 구매하여 적정 농도로 희석 제조 후 HPDE bottle에 넣어 냉장(4℃) 보관
- ASF Ab ELISA Kit 구성품

<표> ASF Ab ELISA Kit의 구성품

명칭	성분	외관상특징
ASFV Ag coated Plate	ASFV 재조합 단백질	은박포장의 96well plate
20X Washing buffer	0.05%Tween/PBS	투명용기의 무색액상제제
Dilution buffer	PBS	투명용기의 무색액상제제
HRP conjugate	Goat Anti-Pig IgG + HRP	투명용기의 무색액상제제
Substrate solution	Tetramethylbenzidine	불투명용기의 무색액상제제
Stop solution	0.5M Sulfuric acid	투명용기의 무색액상제제
Positive Control	ASF reference serum	투명용기의 무색액상제제
Negative Control	PBS	투명용기의 무색액상제제

	임상검체			Total
		양성 검체	음성검체	
ASF ELISA	Positive	29	1	30
	Negative	0	121	121
	Total	29	122	151
민감도	96.67% (95%신뢰구간: 82.78 - 99.92%)			
특이도	100.0% (95%신뢰구간: 97.00 - 100.00%)			
양성예측도	100.00% (95%신뢰구간: 88.06 - 100.00%)			
음성예측도	99.18% (95%신뢰구간: 95.52 - 99.98%)			

- 러시아 연방수의연구소(The National Research Institute for Vet Virology and Microbiology)를 통해 수입신고를 통해 수입된 ASF 양성혈청 29개와 음성혈청 20개, 그리고 국내에서 ASF 미발생 농장에서 채취된 음성혈청 101를 대상으로, 개발한 ASFV ELISA 시제품을 평가하였음
- ASF ELISA 키트는 민감도 96.7%와 특이도 100%를 나타내었음.
- 또한 ASF ELISA 키트는 양성예측도 100%, 음성예측도 99.2%를 나타내었음.

14) ASF 방어면역 유도 DNA 백신의 시제품 제작 및 시험평가

(1) ASF 방어면역 유도 DNA가 포함된 시제품 제작

- 주관기관에서 개발한 재조합 ASF 유전자(Ub, P54, P72, P30, CD2v)를 이용하여 시제품을 제작함
- 상기와 같이 확인된 ASF DNA 항원 (Ub, P54, P72, P30, CD2v)을 이용하여 시제품을 제조하

였음.

- 시제품의 조성은 아래의 표와 같으며, 부형제로는 Poly-L-Glutamic acid sodium salt(PLG)가 추가되었으며, 제조에 대한 기록은 아래와 같음.

(본제 1mL 당)

제조번호	항원 (μg)	부형제
P230901-PJA	Recombinant ASFV pDNA (Ub+P54+P30)	PLG
P230902-PJA		-
P230903-PJA	Recombinant ASFV pDNA (Ub+P72+CD2v)	PLG
P230904-PJA		-

- 시제품을 제조한 뒤, 아래의 그림과 같이 20mL 유리병에 10mL씩 충전하고 캡핑하여 냉장소 (2~8℃)에 보관하였음

(2) ASF 방어면역 유도 DNA백신 시제품 제조 후, 일반시험 실시

- 각 시제품 제조 직후, 국가출하 동물용의약품 검정기준에 의거하여 일반시험을 실시하였음.
- 일반시험에는 성상, 수소이온농도, 무균시험이 포함되어 있음
- 동물용 의약품 국가출하 검정승인 기준 중 일반시험법(1-10-20-01)의 특성(성상)시험법에 따라 색조, 혼탁도, 이물, 이취, 균일도 측정된 결과 모두 적합한 것으로 확인됨.
- 동물용 의약품 국가출하 검정승인 기준 중 일반시험법(1-10-20-03)의 수소 이온 농도 시험법에 따라 pH를 측정된 결과, 모두 적합한 수준(pH6.0~8.0)인 것으로 확인됨.

제조번호	평가항목	보존기간(개월)
		0
P230901-PJA	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
P230902-PJA	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
P230903-PJA	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
P230904-PJA	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합

제조번호	보존기간 (개월, 수소이온농도 평균값)
	0
P230901-PJA	
P230902-PJA	
P230903-PJA	
P230904-PJA	

<시제품의 일반시험 결과-특성시험(좌), 수소이온농도시험(우)>

- 동물용 의약품 국가출하승인 검정기준 중 일반시험법(1-10-20-06)의 무균시험법에 준하여

Blood agar plate(BAP), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar 에 접종하고 7일간 각각 배양 관찰한 결과, 모두 적합임을 확인하였음.

제조번호	구분	보존기간(개월)
		0
P230901-PJA		- ^A
		-
P230902-PJA		-
		-
P230903-PJA		-
		-
P230904-PJA		-
		-

^A 세균발육 음성

<시제품의 일반시험 결과-무균시험 결과>

- (3) ASF 방어면역 유도 ASFV DNA를 포함하는 시제품을 이용한 돼지에서의 면역원성 평가
- 기 제조된 시제품 4종을 공시하고 대상동물인 건강한 자돈(3~5주령)을 각 그룹별로 2마리씩 공시하여 준비함.
 - 시험백신을 1두분(1mL)씩 근육으로 2주간격 2회 접종을 실시하고 14일간 접종부 부작용 및 임상증상(폐사/두수)을 관찰함.
 - 시험결과, 근육으로 정량 접종한 모든 그룹에서 임상증상이 확인되지 않으며, 주사 부위 부작용도 관찰되지 않고, 시험종료 시까지 폐사한 돼지는 없었음.

제조번호	보존기간 (개월, 돼지 임상증상/폐사 두수)
	0
P230901-PJA	0/0
P230902-PJA	0/0
P230903-PJA	0/0
P230904-PJA	0/0

<시제품의 일반시험 결과 - 돼지 안전시험>

- 시험백신을 1두분(1mL)씩 근육으로 2회 접종을 실시하였음. 2차 접종 2주 후, 시험을 종료 하였으며, 샘플 채취를 위해 1차 접종 전, 2차접종 전, 2, 4 주후에 채혈을 실시하고, 혈청을 분리하여 항체가 시험 전까지 -20℃에 보관을 실시하였음.

14) ASF 방어면역 유도 Subunit 백신의 시제품 제작 및 시험평가

(1) ASF 방어면역 유도 Subunit 단백질이 포함된 시제품 제작

- 주관기관(연세대학교 전보영 교수)에서 분양 받은 재조합 ASF 단백질(P30, P104)를 이용하여 시제품을 제작함
- 상기와 같이 확인된 ASF 유전자 재조합 항원 P30과 P104 단백질을 이용하여 시제품을 제조 하였음.
- 시제품의 조성은 아래의 표와 같으며, 보존제로 치메로살(0.01%)가 추가되었으며, 면역증강제인 Adjuvant는 종류에 따라 제조를 실시하였으며, 제조에 대한 기록은 아래 그림과 같음.

시제품의 조성(본제 1mL 당)

1. 유효항원:

- ASF 재조합 단백질(P30) ----- 200 μ g
- ASF 재조합 단백질(P104) ----- 200 μ g

2. 면역증강제: ----- 종류에 따라 다름

- 3. 보존제: 치메로살(Thimerosal) ----- 0.01%

<시제품의 조성>

- 사용한 Adjuvant는 동물용 의약품에서 통상적으로 사용하는 IMS-1313, Montanide gel, 수산화겔(Rehydragel)이며, 이외 면역증강 후보물질로 금화규 추출물과 Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide(DDA)를 적용하였음.

(본제 1mL 당)

제조번호	항원 (μ g)	Adjuvant	보존제
HSK220901-KHS	recombinant ASF P30 recombinant ASF P104	IMS-1313(20%) Montanide gel (10%) 수산화겔(10%) IMS-1313(20%) +금화규 DDA(30 μ g)	치메로살 (0.01%)
HSK220902-KHS			
HSK220903-KHS			
HSK220904-KHS			
HSK220905-KHS			



CTCvac

제조기록서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시퀀스인 V1	제조번호	6mL	단위량	6mL/부
제형 및 성분	우산화겔/금화규	사용기간	-	제품용량서 참조	-
Batch no.	HSK220901-KHS	제조일자	2022.09.30	사용목적	시험용 백신 #1

제조	발명자	제조번호	제조일자	사용기간	제조처사자	제조처시일
최신	김현재	HSK220901-KHS	2022.09.30	-	홍용관	2022.09.01

※참조 사항-

Strain	원료명	허가량	원액 용액 (총용량)	용액	농도	추정량	최종 용액 /부피
Recombinant ASFV protein P 30	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Recombinant ASFV protein P 104	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
IMS-1313	20%	-	-	-	-	1.2ml	-
Thimerosal	0.01%	-	-	-	-	60 μ L	-
1x PBS	-	-	-	-	-	3.34ml	-

※참조사항-

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 합성한 200 μ g/dose의 용기하여 제조.
- IMS-1313를 백신의 Total Volume(6mL)의 10%로 첨가(60 μ L)하여 제조.
- Thimerosal을 0.01%용량 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

CTCvac R&D CONFIDENTIAL 제42/1/1

CTCvac

제조기록서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시퀀스인 V2	제조번호	6mL	단위량	6mL/부
제형 및 성분	우산화겔/금화규	사용기간	-	제품용량서 참조	-
Batch no.	HSK220902-KHS	제조일자	2022.09.30	사용목적	시험용 백신 #2

제조	발명자	제조번호	제조일자	사용기간	제조처사자	제조처시일
최신	김현재	HSK220902-KHS	2022.09.30	-	홍용관	2022.09.01

※참조 사항-

Strain	원료명	허가량	원액 용액 (총용량)	용액	농도	추정량	최종 용액 /부피
Recombinant ASFV protein P 30	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Recombinant ASFV protein P 104	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Montanide gel	10%	-	-	-	-	0.6ml	-
Thimerosal	0.01%	-	-	-	-	60 μ L	-
1x PBS	-	-	-	-	-	3.34ml	-

※참조사항-

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 합성한 200 μ g/dose의 용기하여 제조.
- Montanide gel을 백신의 Total Volume(6mL)의 10%로 첨가(60 μ L)하여 제조.
- Thimerosal을 0.01%용량 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

CTCvac R&D CONFIDENTIAL 제42/1/1

CTCvac

제조기록서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시퀀스인 V3	제조번호	6mL	단위량	6mL/부
제형 및 성분	우산화겔/금화규	사용기간	-	제품용량서 참조	-
Batch no.	HSK220903-KHS	제조일자	2022.09.30	사용목적	시험용 백신 #3

제조	발명자	제조번호	제조일자	사용기간	제조처사자	제조처시일
최신	김현재	HSK220903-KHS	2022.09.30	-	홍용관	2022.09.01

※참조 사항-

Strain	원료명	허가량	원액 용액 (총용량)	용액	농도	추정량	최종 용액 /부피
Recombinant ASFV protein P 30	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Recombinant ASFV protein P 104	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Thimerosal	10%	-	-	-	-	0.6ml	-
Thimerosal	0.01%	-	-	-	-	60 μ L	-
1x PBS	-	-	-	-	-	3.34ml	-

※참조사항-

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 합성한 200 μ g/dose의 용기하여 제조.
- Thimerosal을 백신의 Total Volume(6mL)의 10%로 첨가(60 μ L)하여 제조.
- Thimerosal을 0.01%용량 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

CTCvac R&D CONFIDENTIAL 제42/1/1

CTCvac

제조기록서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시퀀스인 V4	제조번호	6mL	단위량	6mL/부
제형 및 성분	우산화겔/금화규	사용기간	-	제품용량서 참조	-
Batch no.	HSK220904-KHS	제조일자	2022.09.30	사용목적	시험용 백신 #4

제조	발명자	제조번호	제조일자	사용기간	제조처사자	제조처시일
최신	김현재	HSK220904-KHS	2022.09.30	-	홍용관	2022.09.01

※참조 사항-

Strain	원료명	허가량	원액 용액 (총용량)	용액	농도	추정량	최종 용액 /부피
Recombinant ASFV protein P 30	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Recombinant ASFV protein P 104	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
IMS-1313	20%	-	-	-	-	1.2ml	-
Thimerosal	0.01%	-	-	-	-	60 μ L	-
1x PBS	-	-	-	-	-	2.64ml	-

※참조사항-

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 합성한 200 μ g/dose의 용기하여 제조.
- Rehydragel을 백신의 Total Volume(6mL)의 10%로 첨가(60 μ L)하여 제조.
- Thimerosal을 0.01%용량 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

CTCvac R&D CONFIDENTIAL 제42/1/1

CTCvac

제조기록서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시퀀스인 V5	제조번호	6mL	단위량	6mL/부
제형 및 성분	우산화겔/금화규	사용기간	-	제품용량서 참조	-
Batch no.	HSK220905-KHS	제조일자	2022.09.30	사용목적	시험용 백신 #5

제조	발명자	제조번호	제조일자	사용기간	제조처사자	제조처시일
최신	김현재	HSK220905-KHS	2022.09.30	-	홍용관	2022.09.01

※참조 사항-

Strain	원료명	허가량	원액 용액 (총용량)	용액	농도	추정량	최종 용액 /부피
Recombinant ASFV protein P 30	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
Recombinant ASFV protein P 104	200 μ g/dose	1.0mg/ml	4ml	-	0.8ml	200 μ g/dose	6mL
DDA	30 μ g/dose	0.25mg/ml	-	-	-	0.27ml	-
Thimerosal	0.01%	-	-	-	-	60 μ L	-
1x PBS	-	-	-	-	-	3.23ml	-

※참조사항-

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 합성한 200 μ g/dose의 용기하여 제조.
- Adjuvant인 DDA(Dimethyldioctadecylammonium bromide)는 0.25 μ g/100 μ L으로 첨가하여 제조하였다.
- DDA를 10배 희석하여 0.25mg/ml의 농도로 30 μ g/dose의 용액 첨가하여 제조한다.
- Thimerosal을 0.01%용량 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

CTCvac R&D CONFIDENTIAL 제42/1/1

<시제품의 제조 정보(좌상), 제조된 시제품(우상) 및 제조기록>

- 시제품을 제조한 뒤, 아래의 그림과 같이 20mL 유리병에 10mL씩 충전하고 캡핑하여 냉장소 (2~8℃)에 보관하였음

(2) ASF 방어면역 유도 Subunit 단백질이 포함된 시제품 제조 후, 일반시험 실시

- 각 시제품 제조 직후, 국가출하 동물용의약품 검정기준에 의거하여 일반시험을 실시하였음.
- 일반시험에는 성상, 수소이온농도, 무균시험이 포함되어 있음
- 동물용 의약품 국가출하 검정승인 기준 중 일반시험법(1-10-20-01)의 특성(성상)시험법에 따라 색조, 혼탁도, 이물, 이취, 균일도 측정된 결과 모두 적합한 것으로 확인됨.
- 동물용 의약품 국가출하 검정승인 기준 중 일반시험법(1-10-20-03)의 수소 이온 농도 시험 법에 따라 pH를 측정된 결과, 모두 적합한 수준(pH6.0~8.0)인 것으로 확인됨.

제조번호	평가항목	보존기간(개월)
		0
HSK220901-KHS	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
HSK220902-KHS	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
HSK220903-KHS	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
HSK220904-KHS	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합
HSK220905-KHS	색조	적합
	혼탁도	적합
	이물, 이취	적합
	균일도	적합

제조번호	보존기간 (개월, 수소이온농도 평균값)
	0
HSK220901-KHS	7.3
HSK220902-KHS	7.1
HSK220903-KHS	7.0
HSK220904-KHS	6.9
HSK220905-KHS	7.3

<시제품의 일반시험 결과-특성시험(좌), 수소이온농도시험(우)>

- 동물용 의약품 국가출하승인 검정기준 중 일반시험법(1-10-20-06)의 무균시험법에 준하여 Blood agar plate(BAP), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar에 접종하고 7일간 각각 배양 관찰한 결과, 모두 적합임을 확인하였음.

시험기록서 Test Record Form			결 재	확인자
시험성적번호	N/A	접수번호	N/A	
품목명	ASF 시험백신 V2			
품목코드	HSK220902-KHS			
- 특성시험 (22년 9월 30일) 유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정치하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.				
- 무균시험 (22년 10월 05일)				
배양온도	32.5°C			
배지	BAP	XLD		
원액	X	X		
2배 희석	X	X		
10배 희석	X	X		
- 수소이온농도시험 (22년 10월 11일) pH 측정 결과 : 7.1 측정 완료(적합)				
시험자 서명/일자	/ 22.10.11			

시험 결과보고서 Test Result Report				시험자	부서책임자
시험성적번호	n/a	접수번호	n/a		
구분	<input type="checkbox"/> 원료 <input type="checkbox"/> 자재 <input checked="" type="checkbox"/> 반제품 <input type="checkbox"/> 완제품 <input type="checkbox"/> 반품 <input type="checkbox"/> 제조용수 <input type="checkbox"/> 기타()				
품목명	ASF 시험백신 V1				
제조번호	HSK220901-KHS	제조수량	6 ml		
제조일자	22.09.30	제조처	㈜씨티씨백		
시험규격	별규	사용기한	N/A		

시험항목	허가기준/사기기준	결과	적/부	시험자	시험일자
특성시험	유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정치하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.	이물, 이취가 없으며 내용물의 성상이 균일함.	적합		22.09.30
무균시험	시험 결과 어떠한 세균도 발육이 인정되어서는 안됨.	어떠한 세균의 발육도 안됨.	적합		22.10.05
수소이온농도시험	pH 6.0 ~ 8.0	7.3	적합		22.10.11
최종판정		판정일자	<비고>		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합		22.10.11			

시험기록서 Test Record Form			결 재	확인자
시험성적번호	N/A	접수번호	N/A	
품목명	ASF 시험백신 V1			
품목코드	HSK220901-KHS			
- 특성시험 (22년 9월 30일) 유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정치하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.				
- 무균시험 (22년 10월 05일)				
배양온도	32.5°C			
배지	BAP	XLD		
원액	X	X		
2배 희석	X	X		
10배 희석	X	X		
- 수소이온농도시험 (22년 10월 11일) pH 측정 결과 : 7.3 측정 완료(적합)				
시험자 서명/일자	/ 22.10.11			



제 조 기 록 서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시험백신 V3	제조단위	6ml	단위량	6ml/6두
제형 및 성상	주사제/백색의 유탁액	사용기간	-	제품표준서 번호	-
Batch no.	HSK220903-KHS	제조목적	시험용 백신 #3		

제조 지시	발행자	제조번호	제조일자	사용기한	제조지시자	제조지시일
	김현석	HSK220903-KHS	2022.09.30	-	원용관	2022.09.01

<원료 사용량>

Strain	원료명	허가량	원액 역가 (농축전)	원액 재고량	농축	투입량	최종 역가 /dose
	Recombinant ASFV protein (P 30)	200ug/dose	1.5mg/ml	4ml	-	0.8ml	200ug/dose
	Recombinant ASFV protein (P 104)	200ug/dose	1.0mg/ml	6ml	-	1.2ml	200ug/dose
	Rehydra-gel	10%	-	-	-	0.6ml	-
	Timerosal	0.01%	-	-	-	60ul	-
	1x PBS	-	-	-	-	3.34ml	-
							6ml

<특기사항>

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 항원당 200ug/dose씩 첨가하여 제조.
- Rehydra-gel을 백신의 Total Volume(6ml)의 10%로 첨가(0.6ml)하여 제조.
- Timerosal을 0.01%첨가 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.



시험 결과보고서

시험 결과보고서 Test Result Report		결 재	시험자	부서책임자
시험성적번호	n/a	접수번호	n/a	
구분	<input type="checkbox"/> 원료 <input type="checkbox"/> 자재 <input checked="" type="checkbox"/> 반제품 <input type="checkbox"/> 완제품 <input type="checkbox"/> 반품 <input type="checkbox"/> 제조용수 <input type="checkbox"/> 기타()			
품목명	ASF 시험백신 V3			
제조번호	HSK220903-KHS	제조수량	6 ml	
제조일자	22.09.30	제조처	㈜비티씨백	
시험규격	별규	사용기한	N/A	

시험항목	허가기준/자가기준	결과	적/부	시험자	시험일자
특성시험	유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 경지하면 약간의 침전물이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.	이물, 이취가 없으며 내용물의 성상이 균일함.	적합		22.09.30
무균시험	시험 결과 어떠한 세균도 발육이 인정되어서는 안됨.	어떠한 세균의 발육도 안됨	적합		22.10.05
수소이온농도시험	pH 6.0 ~ 8.0	7.0	적합		22.10.11
최종판정		판정일자	<비고>		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합		22.10.11			



제 조 기 록 서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시험백신 V4	제조단위	6ml	단위량	6ml/6두
제형 및 성상	주사제/백색의 유탁액	사용기간	-	제품표준서 번호	-
Batch no.	HSK220904-KHS	제조목적	시험용 백신 #4		

제조 지시	발행자	제조번호	제조일자	사용기한	제조지시자	제조지시일
		HSK220904-KHS	2022.09.30	-		2022.09.01

<원료 사용량>

Strain	원료명	허가량	원액 역가 (농축전)	원액 재고량	농축	투입량	최종 역가 /dose
	Recombinant ASFV protein (P 30)	200ug/dose	1.5mg/ml	4ml	-	0.8ml	200ug/dose
	Recombinant ASFV protein (P 104)	200ug/dose	1.0mg/ml	6ml	-	1.2ml	200ug/dose
	IMS-1313	20%	-	-	-	1.2ml	-
	Timerosal	0.01%	-	-	-	60ul	-
	금화규 원액		10mg/ml			0.1ml	
	1x PBS	-	-	-	-	2.64ml	-
							6ml

<특기사항>

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 항원당 200ug/dose씩 첨가하여 제조.
- Rehydra-gel을 백신의 Total Volume(6ml)의 10%로 첨가(0.6ml)하여 제조.
- Timerosal을 0.01%첨가 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.



시험 결과보고서

시험 결과보고서 Test Result Report		결 재	시험자	부서책임자
시험성적번호	n/a	접수번호	n/a	
구분	<input type="checkbox"/> 원료 <input type="checkbox"/> 자재 <input checked="" type="checkbox"/> 반제품 <input type="checkbox"/> 완제품 <input type="checkbox"/> 반품 <input type="checkbox"/> 제조용수 <input type="checkbox"/> 기타()			
품목명	ASF 시험백신 V4			
제조번호	HSK220904-KHS	제조수량	6 ml	
제조일자	22.09.30	제조처	㈜비티씨백	
시험규격	별규	사용기한	N/A	

시험항목	허가기준/자가기준	결과	적/부	시험자	시험일자
특성시험	유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 경지하면 약간의 침전물이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.	이물, 이취가 없으며 내용물의 성상이 균일함.	적합		22.09.30
무균시험	시험 결과 어떠한 세균도 발육이 인정되어서는 안됨.	어떠한 세균의 발육도 안됨	적합		22.10.05
수소이온농도시험	pH 6.0 ~ 8.0	6.9	적합		22.10.11
최종판정		판정일자	<비고>		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합		22.10.11			

시험기록서 Test Record Form		결 재	확인자
시험성적번호	N/A	접수번호	N/A
품목명	ASF 시험백신 V4		
품목코드	HSK220904-KHS		
- 특성시험 (22년 9월 30일) 유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정치하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.			
- 무균시험 (22년 10월 05일)			
배양온도		32.5°C	
배지	BAP	XLD	
원액	X	X	
2배 희석	X	X	
10배 희석	X	X	
- 수소이온농도시험 (22년 10월 11일) pH 측정 결과 : 6.9 측정 완료(적합)			
시험자 서명/일자	22.10.11		

제 조 기 록 서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시험백신 V2	제조단위	6ml	단위량	6ml/6두	
제형 및 성상	주사제/백색의 유탁액	사용기간	-	제품표준서 번호	-	
Batch no.	HSK220902-KHS	제조목적	시험용 백신 #2			
제조 지시	발행자	제조번호	제조일자	사용기한	제조지시자	
		HSK220902-KHS	2022.09.30	-	2022.09.01	
<원료 사용량>						
Strain	원 료 명	허가량	원액 용액 (농축진)	원액 재고량	농축 투입량	최종 여가 /dose
	Recombinant ASFV protein (P 30)	200ug/dose	1.5mg/ml	4ml	-	0.8ml
	Recombinant ASFV protein (P 104)	200ug/dose	1.0mg/ml	6ml	-	1.2ml
	Montanide-gel	10%	-	-	-	0.6ml
	Timerosal	0.01%	-	-	-	60ul
	1x PBS	-	-	-	-	3.34ml
6ml						
<특기사항>						
- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 항원당 200ug/dose씩 첨가하여 제조. - Montanide-gel을 백신의 Total Volume(6ml)의 10%로 첨가(0.6ml)하여 제조. - Timerosal을 0.01%첨가 후 나머지 남는 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다. - 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.						

시험 결과보고서 Test Result Report		결 재	시험자	부서책임자	
시험성적번호	n/a	접수번호	n/a		
구분	<input type="checkbox"/> 원료 <input type="checkbox"/> 자재 <input checked="" type="checkbox"/> 반제품 <input type="checkbox"/> 완제품 <input type="checkbox"/> 반품 <input type="checkbox"/> 제조용수 <input type="checkbox"/> 기타()				
품목명	ASF 시험백신 V5				
제조번호	HSK220905-KHS	제조수량	6 ml		
제조일자	22.09.30	제조처	위씨티씨백		
시험규격	별규	사용기한	N/A		
시험항목	허가기준/저가기준	결과	적/부	시험자	시험일자
특성시험	유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정치하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.	이물, 이취가 없으며 내용물의 성상이 균질함.	적합		22.09.30
무균시험	시험 결과 어떠한 세균도 발육이 인정되어서는 안됨.	어떠한 세균의 발육도 안됨	적합		22.10.05
수소이온농도시험	pH 6.0 - 8.0	7.3	적합		22.10.11
최종판정		판정일자	<비고>		
<input checked="" type="checkbox"/> 적합 <input type="checkbox"/> 부적합		22.10.11			

시험기록서 Test Record Form		결 재	확 인 자
시험성적번호	N/A	접수번호	N/A
품목명	ASF 시험백신 V3		
품목코드	HSK220903-KHS		
- 특성시험 (22년 9월 30일) 유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정지하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.			
- 무균시험 (22년 10월 05일)			
배양온도	32.5°C		
배지	BAP	XLD	
원액	X	X	
2배 희석	X	X	
10배 희석	X	X	
- 수소이온농도시험 (22년 10월 11일) pH 측정 결과 : 7.0 측정 완료(직접)			
시험자 서명/일자	/ 22.10.11		

제 조 기 록 서 (연구개발본부)
(Batch record- R&D Division)

제품명	ASF 시험백신 V5	제조단위	6ml	단위량	6ml/6두
제형 및 성상	주사제/백색의 유탁액	사용기간	-	제품표준서 번호	-
Batch no.	HSK220905-KHS	제조목적	시험용 백신 #5		

제조 지시	발행자	제조번호	제조일자	사용기한	제조지시자	제조지시일
		HSK220905-KHS	2022.09.30	-		2022.09.01

<원료 사용량>

Strain	원료명	허가량	원액 여가 (농축진)	원액 제고량	농축	투입량	최종 여가 /dose
	Recombinant ASFV protein (P 30)	200ug/dose	1.5mg/ml	4ml	-	0.8ml	200ug/dose
	Recombinant ASFV protein (P 104)	200ug/dose	1.0mg/ml	6ml	-	1.2ml	200ug/dose
	DDA	30ug/dose	0.25mg/ml	-	-	0.72ml	-
	Timerosal	0.01%	-	-	-	60ul	-
	1x PBS	-	-	-	-	3.22ml	-
							6ml

<특기사항>

- Recombinant ASFV protein P 30 / P 104를 항원당 200ug/dose씩 첨가하여 제조.
- Adjuvant인 DDA(Dimethyldioctadecylammonium bromide)는 0.25g/100ml으로 첨가하여 Autoclave하여 사용하였다.
- DDA를 10배 희석하여 0.25mg/ml의 농도로 30ug/dose의 맞게 첨가하여 제조한다.
- Timerosal을 0.01%첨가 후 나머지 남은 Volume은 PBS를 첨가하여 제조하였다.
- 항원 및 첨가제(Adjuvant)를 동시에 첨가하여 Mixing한다.

시험기록서 Test Record Form		결 재	확 인 자
시험성적번호	N/A	접수번호	N/A
품목명	ASF 시험백신 V5		
품목코드	HSK220905-KHS		
- 특성시험 (22년 9월 30일) 유백색의 현탁액으로 이물, 이취가 없고 정지하면 약간의 침전층이 생기나 흔들면 균질한 유성액체가 된다.			
- 무균시험 (22년 10월 05일)			
배양온도	32.5°C		
배지	BAP	XLD	
원액	X	X	
2배 희석	X	X	
10배 희석	X	X	
- 수소이온농도시험 (22년 10월 11일) pH 측정 결과 : 7.3 측정 완료(직접)			
시험자 서명/일자	/ 22.10.11		

(3) ASF 방어면역 유도 Subunit 단백질과 면역증강 Adjuvant를 포함하는 시제품을 이용한 돼지에서의 안전성 평가

- 기 제조된 시제품 5종을 공시하고 대상동물인 건강한 자돈(3~5주령)을 각 그룹별로 2마리씩 공시하여 준비함.
- 시험백신을 1두분(1mL)씩 근육으로 2주간격 2회 접종을 실시하고 14일간 접종부 부작용 및 임상증상(폐사/두수)을 관찰함.
- 시험결과, 근육으로 정량 접종한 모든 그룹에서 임상증상이 확인되지 않으며, 주사 부위 부작용도 관찰되지 않고, 시험종료 시까지 폐사한 돼지는 없었음.

제조번호	보존기간 (개월, 돼지 임상증상/폐사 두수)
	0
HSK220901-KHS	0/0
HSK220902-KHS	0/0
HSK220903-KHS	0/0
HSK220904-KHS	0/0
HSK220905-KHS	0/0

<시제품의 일반시험 결과 - 돼지 안전시험>

- 시험백신을 1두분(1mL)씩 근육으로 2회 접종을 실시하였음. 2차 접종 2주 후, 시험을 종료하였으며, 샘플 채취를 위해 1차 접종 전, 2차접종 전, 2, 4 주후에 채혈을 실시하고, 혈청을 분리하여 항체가 시험 전까지 -20℃에 보관을 실시하였음.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) 전장유전체 데이터 생산 조건 확립
 - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 shot gun 시퀀싱 방식
 - 아프리카돼지열병 바이러스 캡처 방식 전장유전체 시퀀싱 방식
 - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 AmpliSeq 시퀀싱 방식 개발
 - ASFV 데이터 분석 파이프라인 구축
 - ASFV assembly
 - ASFV gene annotation
 - ASFV genotype and phylogenetic analysis
 - ASFV WGS 시퀀싱
 - 국내 ASFV 분리주 대상
 - 세계 ASFV 분리주 대상
 - ASFV Genome DB 구축
 - ASFV 유전체 기반 real-time PCR 진단법 개발
 - 진단마커에 대한 real-time PCR용 primer 및 probe 제작
 - ASFV real-time PCR 진단법 제작 최적화
 - ASFV DNA를 이용한 ASFV real-time PCR 진단법 유효성 평가
 - ASFV 유전체 기반 등온 증폭용 LAMP 진단법 개발
 - 진단마커에 대한 신속 검출용 LAMP용 primer 및 probe 제작
 - 신속 검출용 LAMP 진단법 제작 최적화
 - ASFV DNA를 이용한 신속 검출용 LAMP 진단법 유효성 평가
 - ASFV 진단마커를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 개발
 - 진단마커에 대한 신속 검출용 real-time RPA용 primer 및 probe 제작
 - 신속 검출용 real-time RPA 진단법 제작 최적화
 - ASFV DNA를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 유효성 평가
 - 해외(러시아)야외검체를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 유효성 평가
 - 해외(러시아) 신속 검출용 real-time RPA 키트제작 및 사용법 제작
 - ASFV 유전체 기반 백신후보 단백질 개발
 - 식물기반 P30-CD2v 융합단백질 발현시스템 개발
- (2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)**
- 아프리카돼지열병 바이러스 캡처 방식 전장유전체 시퀀싱 방식 셋업 1건
 - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 shot gun 시퀀싱 방식 셋업 1건
 - 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 AmpliSeq 시퀀싱 방식 개발 1건
 - ASFV 데이터 분석 파이프라인 구축
 - ASFV 유전체 DB 구축
 - ASFV 전장유전체 분석 8건
 - ASFV 유전체 기반 real-time PCR 진단법 개발 1건
 - ASFV 유전체 기반 LAMP 등온증폭법 개발 1건

- ASFV 진단마커를 이용한 신속 검출용 real-time RPA 진단법 개발 1건
- 국내학술대회 연구성과 발표 6건
- 국제학술지 연구성과(논문) 발표 1건
- 지식재산권(특허) 2건 출원(국내)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계(1차년도) (2022)		1단계(2년차) (2023)		계	가중치 (%)	
		목표(단계별)	실적(누적)	목표(단계별)	실적(누적)			
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	지식재산권 (특허출원)	목표(단계별)		2		2	30	
		실적(누적)	1	1	1	2		
	논문	목표(단계별)			1		1	
		실적(누적)	1	1	1	1		
	학술발표	목표(단계별)	1		3		4	20
		실적(누적)	4	4	2	2	6	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시 (이전)	목표(단계별)			1		1	30
		실적(누적)						
	인력양성	목표(단계별)			1		1	20
		실적(누적)	1	1	1	1	2	
	계	목표(단계별)	1		8		9	
		실적(누적)	7	7	4	4	11	

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도, 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Development of a Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus Genotype I and II	Pathogens	Ilya Titov (제1저자) Bo-Young Jeon (책임저자)	11	스위스	MDPI	SCIE	2022. 04.05	2076-0817	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회 2022년 추계학술대회	모놀도로바 세집	2022년 11월 17일	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	대한수의학회 2022년 추계학술대회	이성경	2022년 11월 17일	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	KMB 2022 49th Annual Meeting & International Symposium	홍민선,전보영,가학현	2022년 6월 22일	경주 화백컨벤션센터	대한민국
4	KMB 2022 49th Annual Meeting & International Symposium	홍민선,전보영,가학현	2022년 6월 22일	경주 화백컨벤션센터	대한민국
5	2023 대한수의학회 추계학술대회	전보영	2023년 11월 30일	제주국제컨벤션센터	대한민국
6	2023 대한수의학회 추계학술대회	모놀도로바 세집	2023년 11월 30일	제주국제컨벤션센터	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	등록번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도	대한민국	연세대학교원주 산학협력단	2022.04.25	10-2022-0050971					50	
2	차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카돼지열병바이러스 검출방법 및 전장유전체 염기서열분석방법	대한민국	연세대학교원주 산학협력단	2023.12.29	10-2023-0197779					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⁾	인증여부 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

- * 1¹ 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2² 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3³ 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)
1								

□ 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)		

- * 1¹ 기술이전 또는 자기실시
- * 2² 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3³ 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

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

사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수치 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

□ 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	
1		2022	1					1						1
2		2023		1				1						1

□ 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

[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)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함), <u>품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산판매 신고증명서</u>
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

<연구성과 1> (연구논문)



Article

Development of a Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus Genotype I and II

Titov Ilya ^{1,2}, Sezim Monoldorova ¹, Shin-Seok Kang ¹, Seungri Yun ¹, Hyeon-Seop Byeon ³, Nefedeva Mariia ² and Bo-Young Jeon ^{1,4,*}



Citation: Ilya, T.; Monoldorova, S.; Kang, S.-S.; Yun, S.; Byeon, H.-S.; Mariia, N.; Jeon, B.-Y. Development of a Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus Genotype I and II.

Pathogens **2022**, *11*, 439. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040439>

Academic Editor: Marta Martínez-Avilés

Abstract: African swine fever (ASF) is a contagious viral disease in pigs and wild boars which poses a major threat to the pig industry. Rapid and accurate diagnosis is necessary to control ASF. Hence, we developed a rapid diagnostic method using a recombinase polymerase amplification (RPA) assay targeting the conserved sequences of CP204L (p30) that can rapidly detect ASF virus (ASFV) genotype strains I and II. The lower detection limit of the real-time RPA assay was 5×10^1 copies per reaction. The real-time RPA assay effectively detected ASFV isolates and clinical specimens belonging to ASFV genotypes I and II. The sensitivity and specificity of the assay were 96.8% (95% confidence interval (CI): 83.3–99.9) and 100% (95% CI: 88.4–100.0), respectively. The agreement between the real-time RPA assay and a reference commercial real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was 100%. The real-time RPA assay had a detection time of 6.0 min (95% CI: 5.7–6.2), which was significantly shorter than that of qPCR (49 min; 95% CI: 47.4–50.6; $p < 0.001$). Thus, the developed real-time RPA assay is a rapid and accurate diagnostic tool for detecting ASFV genotypes I and II.

Keywords: African swine fever virus (ASFV); recombinase polymerase amplification (RPA); CP204 gene; genotype I; genotype II



大韓獸醫學會誌

제62권 3호 부록

2022년 11월



(사)대한수의학회 2022년 추계학술대회

포스트 코로나 시대의 의약품 및 백신개발에서 수의학의 핵심 전략 Core Strategy of Veterinary Medicine for the Development of Prescriptions and Vaccines in Post-Corona Era

- 일 시 : 2022년 11월 16일(수)~18일(금)
- 장 소 : 제주국제컨벤션센터
- 주 최 : (사)대한수의학회
- 공동주관 : 식품의약품안전처, 국립야생동물질병관리원, 경상국립대학교, 경상국립대학교 산학협력단, 경상국립대학교 야생동물특성화대학원 사업단, 반려동물신약개발사업단, 비교의학질환연구소(서울대 SRC), 서울대학교 수의과대학 BK21 FOUR 미래수의학선도교육연구단, 전북대학교 생체안전성연구소 중점연구소지원사업단, 제주대학교 수의과학연구소, 충남대학교 수의과대학 동물의학연구소 재난형 동물감염병 중점연구소, 충북대학교 반려동물중개 의학암센터, 대한꿀벌수의사회, 대한수의사회, 한국동물매개심리치료학회, 한국예방수의학회, 한국동물보건학회, 한국말임상수의사회, 한국수의생리학협회, 한국수의약리독성학회, 한국수의해부학회, 한국수의해부학회, 한국야생동물센터협의회
- 후 원 : 제주특별자치도, 한국과학기술단체총연합회, 한국마사회, 베링거인겔하임동물약품(주), (주)바이오노트, 주식회사 티시스템, (사)한국농식품생명과학협회
- 협 찬 : 씨에이치디, 바이오노트, (사)제주컨벤션뷰로, FEEL 컨설팅, 나노씨엠에스, 로킵헬스케어, (주)미코바이오메드, 주식회사 티시스템, (주)옵토레인, (주)제트바이오텍, (주)카브, 티젤바이오

사단법인 대한수의학회
The Korean Society of Veterinary Science

“이 발표논문집은 정부재원(과학기술진흥기금 및 복권기금)으로 한국과학기술단체총연합회의 지원을 받아 발간되었습니다”



TIME TABLE

Nov. 16 (Wed)							
Time \ Place	한라홀	삼다홀A	삼다홀B	302	303	로비	
15:00~17:00	Registration						
16:00~17:00				실행위원회		Booth Installation	
17:00~18:00				이사회			
Nov. 17 (Thu)							
Time \ Place	한라홀	삼다홀A	삼다홀B	302	303	로비	
08:30~16:00	Registration						
09:00~10:30	Symposium 1 [한국동물매개심리치료학회] Mechanism of the Health Benefits by Animal Assisted Therapy	Symposium 2 [반려동물신약개발사업단] New Drug Development for Companion Animals	Symposium 3 [야생동물 질병 특성화대학원사업단 (국립야생동물질병관리원)] Wild Animal Diseases and Prevention	Symposium 4 [대한수의사회 재난형동물감염병특위] Recent Issues of Animal Infectious Diseases and Animal Health Policy	Oral Presentation 1	Poster 1 (09:00~12:30)	
10:30~10:45	Coffee Break						
10:45~11:00	Opening Ceremony (한라홀)						
11:00~12:00	Plenary Lecture (한라홀) COVID-19 Vaccine Development: Success Factors and Medical Unmet Needs (김우주 / 고려대학교 구로병원 감염내과)						
12:00~14:00	Lunch (오션뷰)				JVS Editor Meeting	교체시간	
14:00~15:30	Symposium 5 [한국수의해부학회] Morphological Research Trends in Central Nervous System	Symposium 6 [한국예방수의학회] Prospective of Veterinary Forensics and Medicinal Products for Companion Animal	Symposium 7 [전북대학교 생체안전성연구소] Infection and Immunity in Veterinary Science	Symposium 8 [대한꿀벌수의사회] Honey Bee Colony Loss and Veterinary Medicine	Oral Presentation 2	Poster 2 (13:30~17:00)	
15:30~15:50	Coffee Break						
15:50~17:20	Symposium 9 [한국동물보건학회] An Academic Conference in Autumn for Veterinary Nursing	Symposium 10 [제주대학교 수의과학연구소] Strategies of Vaccine Development and Efficacy Improvement	Symposium 11 Current Update on Application and Development of Cell Therapy	Oral Presentation 3	Oral Presentation 4		
17:20~17:30	Coffee Break						
17:30~18:00	Special Lecture (한라홀)						
18:00~19:30	Welcome Reception (탐라홀)						

Booth Exhibition

P-260

MiRNA array and gene expression of benign spleen mass and hemangiosarcoma

Eun Pyo Kim¹, Wan Hee Kim², Geon A Kim³

¹Department of Theriogenology and Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ²Department of Veterinary Clinical Science, College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ³Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, Uijeongbu, Republic of Korea

P-261

Efficacy of 3D-printed Allogenic biomaterial implant for the Regeneration of Knee Articular Cartilage in Canine Trochlear Block Recession Models

Hansol Lee¹, Daesik Kim¹, Daeyun Seo¹, Taekyu Chung¹, Seongsoo Lim¹, Beomkwan Namgung¹, Ahreum Choe¹, Janghwan Kim², Jinwook Kim², Minsu Kim^{1,*}

¹Department of Veterinary Emergency Medicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Science, Seoul National University, Gwanak-ro 1, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea, 08826, ²ROKIT Healthcare Inc., 12F Digital-ro-10-gil 9, Keumcheon-gu, Seoul, Republic of Korea

P-262

Detection of African swine fever Virus using Recombinase Polymerase Amplification assay

Sezim Monoldorova¹, Iliia Titov², Shinseok Kang³, Jumi Ahn¹, Seungri Yun¹, Sungkyeong Lee¹, Bo Young Jeon^{1,*}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493 Korea, ²Federal Research Institute of Virology and Microbiology, Russian Academy of Agriculture Science, Pokrov, Russia, ³One Health Frontier, Wonju 26493 Korea

P-263

Electrocardiographic artificial intelligence device for diagnosis of canine heart problem: Retrospective analysis from June 2020 to December 2021

Taekyu Chung¹, Daesik Kim¹, Daeyun Seo¹, Hansol Lee¹, Seongsoo Lim¹, Beomkwan Namgung¹, Ahreum Choe¹, Hyejeong Hong¹, Heesung Umh¹, Youngwon Lee², Minsu Kim^{1,*}

¹Department of Veterinary Emergency Medicine, College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Science, Seoul National University, Gwanak-ro 1, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea, 08826, ²TrustBridge Co. Ltd, #107, 15F, D-CUBE Business Center, 662, Gyeongin-ro, Guro-gu, Seoul, Republic of Korea, 08209

P-264

Primary Renal Chondrosarcoma in a Dog

Jeongmin Lee, Joonghyun Song, Kun-Ho Song*

Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

P-265

Determining the optimal thawing conditions for frozen dog spermatozoa in cryovials

Saddah Ibrahim^{1,2}, Yubyeol Jeon¹, Il Jeong Yu^{1,*}

¹Laboratory of Theriogenology and Reproductive Biotechnology, College of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan 54596, Republic of Korea, ²Department of Veterinary Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Sudan University of Science and Technology, Khartoum 11111, Sudan

P-266

Incidental Finding of Ventricular Septal Defect after Balloon Valvuloplasty of Pulmonic Stenosis in a Dog

Han-Joon Lee, Jeongmin Lee, Joong-Hyun Song, Kun-Ho Song*

Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

P-267

Oleic acid induced apoptosis in NSCLC cells under the glucose starvation

Yeseul Yang^{1,2}, Jae-Ha Jung^{1,2}, Dansong Seo¹, Soyeon Cho^{1,2}, Gocun Cha¹, Jin¹, Yongbaek Kim^{1,3,*}

¹Laboratory of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, The Republic of Korea 08826, ²Program for Creative Veterinary Science Research, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, The Republic of Korea 08826, ³Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, The Republic of Korea 08826

P-268

Development and application of a customized fluid set suitable for the composition of porcine body fluids

Seongju Lee, Areeg Almubarak, Rana Osman, Il-Jeong Yu, Yubyeol Jeon*
Department of Theriogenology and Reproductive Biotechnology, College of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

P-269

Myo-inositol improves semen quality and the fertilizing ability of cryopreserved boar semen

Rana Osman, Areeg Almubarak, Seongju Lee, Il-Jeong Yu, Yubyeol Jeon*
Department of Theriogenology and Reproductive Biotechnology, College of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

P-270

SIRT1 and PLIN2 expression is associated with porcine embryo development competence following Niacin treatment

Areeg Almubarak, Rana Osman, Seongju Lee, Il-Jeong Yu, Yubyeol Jeon*
Department of Theriogenology and Reproductive Biotechnology, College of Veterinary Medicine and Bio-safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

P-271

Reference intervals for hematological and biochemical parameters in healthy Halla horses

Sungryong Kim^{1,†}, Seung-Ho Ryu^{2,†}, Ji-Won Yoo¹, Byung-San Kim¹, Ki-Jeong Na^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea, ²Cheju Halla University, Jeju 63092, Korea

P-325

Evaluation of a multiplex quantitative real-time PCR panel for the detection of avian respiratory pathogensPhyo Wai Win¹, MyeongSu Kim^{1,2}, Jae-Ik Han^{1,2,*}¹Laboratory of Wildlife Medicine, College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea, ²Jeonbuk Wildlife Center, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

P-326

Comparison of high-performance liquid chromatography with sucrose density gradient ultracentrifugation for the quantification of foot-and-mouth disease vaccine

Dohyun Kim, Ah-Young Kim, Sun Young Park, Sang Hyun Park, Jong-Hyeon Park, Young-Joon Ko*

Center for FMD Vaccine Research, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

P-327

Modification of carboxy-terminal amino acid composition to enhance expression of foot-and-mouth disease virus VP4 protein

Dohyun Kim, Sun Young Park, Sang Hyun Park, Jong-Hyeon Park, Young-Joon Ko*

Center for FMD Vaccine Research, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

P-328

Development of solid-phase competitive ELISA for detection of structural protein antibodies against foot and mouth disease virus serotype Asia 1Youjin Han^{1,2}, Hyun-Ji Seo¹, Mi-Young Park¹, Jieun Ryu¹, Gyeong Min Lee¹, Tae-Woon Kim¹, Jungho Kim³, JaeMyoung Kim¹, Jong-Soo Lee², Eun-Jin Choi^{1,*}¹Foot and Mouth Disease Diagnostic Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea, ²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon-si, Republic of Korea, ³BIONOTE Inc., Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

P-329

Evaluation of the immunogenicity and safety of novel live attenuated vaccine candidates against porcine epidemic diarrhea virus and porcine rotavirus in growing pigs

Gyu-Nam Park, SeEun Choe, Bang-Hun Hyun, Dong-Jun An*

Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongbuk-do, 39660, Republic of Korea

P-330

Attenuation and characterization of genotype 2b Korean porcine epidemic diarrhea virus with partial deletions in the spike gene

Gyu-Nam Park, Sok Song, SeEun Choe, Bang-Hun Hyun, Dong-Jun An*

Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, Gyeongbuk-do, 39660, Republic of Korea

P-331

Evaluation of nutrient digestibility on various ingredient as a protein source in pet food for dogs

Kihyun Kim, Ju Lan Chun, Min Young Lee, Kangmin Seo, Hyun-Woo Cho*

Animal Welfare Research Team, National Institute of Animal Science

P-332

The high immunogenicity of self-assembled VLP vaccine of FMDV Asia1-type produced in *E. coli* expression systemBong Yoon Kim^{1,*}, Sang-Cheol Yoo¹, Inkyu Lee¹, Sung-Ho Shin², Seoung-Yun Hwang², Jae-Taek Han¹, Ji-Young Kim¹, Young-Cheon Song³, Jong-Hyeon Park²¹Watson RnD inc., ²Animal and Plant Quarantine Agency, ³Sahmyook University

P-333

Effect of psychotherapy program using therapy insects on depression and self-esteem in the elderlyWon-Guk Kang¹, Yun-Seok Jang², Sun-Ju So², Hyun-A Lee³, Okjin Kim^{3,*}¹Korean Association of Animal Assisted Psychotherapy, ²Department of Agronomy Major Applied Animal Science, Graduate School Won Kwang University, Iksan, Korea, ³Center for Animal Resources Development

P-334

Effect of psychotherapy program using therapy insects on children's life-respect consciousness and emotional stabilityWon-Guk Kang¹, Yun-Seok Jang², Sun-Ju So², Hyun-A Lee³, Okjin Kim^{3,*}¹Korean Association of Animal Assisted Psychotherapy, ²Department of Agronomy Major Applied Animal Science, Graduate School Won Kwang University, Iksan, Korea, ³Center for Animal Resources Development

P-335

Population of ticks and detection of Tick borne disease (TBD) in 2022

Seungri Yun, Sezim Monoldorova, Sungkyeong Lee, Boyoung Jeon*

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Republic of Korea

P-336

Development of a Highly Sensitive Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of African Swine Fever VirusSungkyeong Lee¹, Sezim Monoldorova¹, Seungri Yun¹, Iliia Titov², Bo-Young Jeon^{1,*}¹Department of Biomedical laboratory science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493 Korea, ²Federal Research Institute of Virology and Microbiology, Russian Academy of Agriculture Science, Pokrov, Russia



Development of a Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Detection of African Swine Fever Virus

Sungkyeong Lee¹, Sezim Monoldorova¹, Seungri Yun¹, Iliia Titov²,
Shinseok Kang³, Jumi Ahn¹, Bo-Young Jeon^{1,*}

¹Department of Biomedical laboratory science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493 Korea

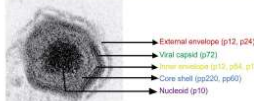
²Federal Research Institute of Virology and Microbiology, Russian Academy of Agriculture Science, Pokrov, Russia

³One Health Frontier, Wonju 26493 Korea

Abstract

African swine fever (ASF), is highly contagious disease in both domesticated pigs and wild boars, is caused by African swine fever virus (ASFV). ASFV is an enveloped virus with a large double stranded DNA genome belonging to the member of the family *Asfarviridae* and genus *Asfivirus*. ASFV can cause high fever (approximately 41–42°C), vomiting, diarrhea, hemorrhage of eyes and skin, and high morbidity and mortality maximum 100% in pigs. In 1921, the first outbreak of ASFV emerged in Kenya, it has continued to circulate and spread in Europe, Russia, and South Africa subsequently. Most recently, ASFV was first reported in China in August 2018 and spread to Republic of Korea in September 2019. Since its identification in 1921, outbreaks of ASFV have been reported in more than 60 countries around the world. Thus, high sensitivity and specificity detection is important to decrease a serious threat to the global swine industry and national economies. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) is a widely used diagnostic method due to high sensitivity and accuracy. Therefore, we developed qPCR assay targeting conserved region of the viral p72 gene, involved in virus attachment to permissive cells, and capable of detecting multiple genotypes. Our qPCR assay detected more specific ASFV and had more sensitive than OIE-recommended qPCR use TaqMan.

Introduction



African swine fever virus (ASFV)

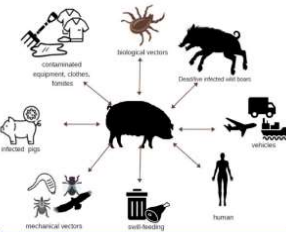
- The sole member of the family *Asfarviridae*, only known DNA arbovirus
- Large double-stranded DNA genome ranging from 170 to 190 kilobase pairs (kbp) that encodes more than 150 open reading frames (ORFs)
- The virion is ~200nm in diameter and possesses a multi-layered structure consisting of the nucleoid, core shell, inner envelope, capsid, and a host-derived outer envelope
- The p72 major capsid protein and four minor capsid proteins make up the viral capsid

Viral p72 gene

- Genotyping of ASFV has been based on a 478bp variable region in the C-terminus of the viral p72 gene
- Both, conventional and Real-time quantitative PCR (qPCR) formats targeting conserved regions of the viral p72 gene

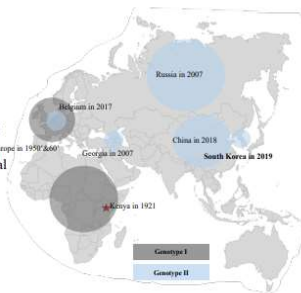
Transmission of ASFV

- Transmission between pigs and boars can occur at the livestock-wildlife interface
- ASFV can be transmitted between soft ticks of the *Ornithodoros erraticus* complex and domestic swine, and ticks serve as persistent reservoirs for the virus



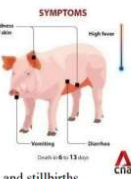
Epidemiology of ASFV

- <Genotype I >
 - The first emergence of ASFV was in Kenya in 1921
 - Between the late 1950s and early 1980s, ASFV emerged in Europe, Russia, and South Africa
- <Genotype II >
 - In 2007, highly virulent genotype II ASFV strain occurred in the Caucasus region and spread into the Russian Federation and Europe
 - In 2018, Reaching to China and spread to several neighboring countries in South Asia including South Korea



Symptoms

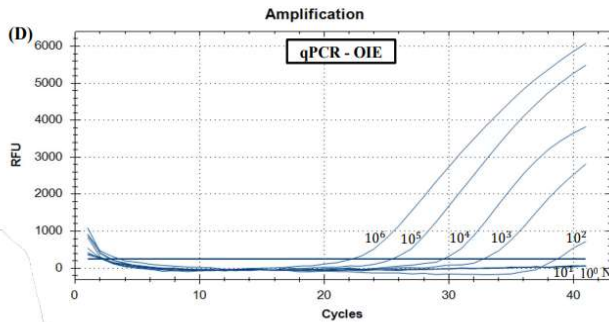
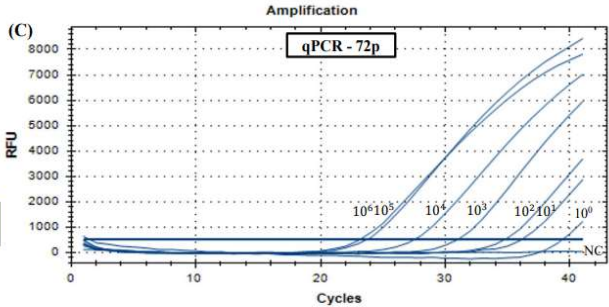
- High fever, coughing or labored breathing
- Weakness and difficult standing
- Vomiting and Diarrhea
- Red or blue blotches around ears and snout
- Miscarriage, abortions, and stillbirths
- High proportions with the disease will die within 10 days



Results

Name	Target	Sequence 5'-3'
72p-2F	p72 gene	GCTCTTACATACCCTTCCACTAC
72p-2R		FAM-ACGCACACTACGGAGGCAATGCCATT-BHQ1
72p-2P		GTATTCTCCCTGGTGGCTTC

Name	Target	Sequence 5'-3'
ASFV_VP72_gBlock	p72 gene	CCCCGTACGATCCGATCACATTACCTATTATTAATAAAC ATTCCGTAACATGCATGGTATCAATCTATCGATAAGT TTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTTACATACCCTTCCACT ACGGAGGCAATGCAATTAACCCCGATGATCGGGT GCGATGATGATCACTTTGGCTTGAAGCCACGGGAGGA ATACCAACCAAGTGGTCATATTAACGATACAGAGCAAG AGAATTTATATAGTTGGGACACGGATTACGTGGGTC TATCACTACCGCTGATCTGTGGTATCGGCAATCTGATT AACCTTCTTCTTCTCAGAACGGTTCAGCTGTGGTCG



(A) Primers 72p-3F:CTTCCACTACGGAGGCAAT and 72p-3R:TGCTTTGAAGCCACGGGAGGAATA were designed and amplify viral p72 gene of ASFV and qPCR amplicons were detected with a hydrolysis probe 72p-3P: FAM - ACGTTAATGACCCTGGGTT - BHQ1. (B) An amplification target sequence of the viral p72 gene were custom-synthesized by Integrated DNA Technologies Inc. (IDT Inc., Coralville, IA, USA). (C) Ten-fold serial dilutions of target DNA (p72 gene) were subjected to amplification with 72p-3F, 72p-3R primers, and 72p-3P probe. (D) Ten-fold serial dilutions of target DNA (p72 gene) were subjected to amplification with OIE-3F, OIE-3R primers, and OIE-3P probe (World Organization for Animal Health(OIE)).

Conclusions

- In this study, we have developed a Real-time quantitative PCR method for the detection of the viral p72 gene of ASFV using designed primers, probe, and synthesized positive control DNA.
- Testing of developed method was performed on samples, which belongs to genotype 2, which is the most widespread in different countries (36 samples total).
- The detection limit of the qPCR which was designed in this study was 5×10^0 copies.
- Our qPCR assay detected more specific ASFV and had more sensitive than OIE-recommended qPCR use TaqMan.

References

[1] Gaudreault, Natasha N., et al. "African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus." *Frontiers in veterinary science* 7 (2020): 215.
 [2] Olasz, Ferenc, et al. "A simple method for sample preparation to facilitate efficient whole-genome sequencing of African swine fever virus." *Viruses* 11.12 (2019): 1129.
 [3] Ilya, Titov, et al. "Development of a Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Rapid Detection of African Swine Fever Virus Genotype I and II." *Pathogens* 11.4 (2022): 439.
 [4] Turlewicz-Podbielska, H.; Kuriga, A.; Niemyski, R.; Tarasiuk, G.; Pomorska-Mól, M. African Swine Fever Virus as a Difficult Opponent in the Fight for a Vaccine—Current Data. *Viruses* 2021, 13, 1212. <https://doi.org/10.3390/v13071212>



Detection of African Swine Fever Virus (ASF) using Recombinase Polymerase Amplification assay

Monoldorova Sezim¹, Titov Iliia², Shinseok Kang³, Jumi Ahn¹, Seungri Yun¹, Sungkyeong Lee¹, Bo-Young Jeon^{1*}

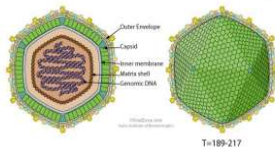
¹Department of Biomedical laboratory science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493 Korea
²Federal Research Institute of Virology and Microbiology, Russian Academy of Agriculture Science, Pokrov, Russia
³One Health Frontier, Wonju 26493 Korea

Abstract

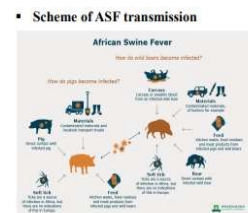
African swine fever (ASF) is a serious contagious pig disease that produces a wide range of clinical signs and lesions. ASF virus (ASFV), the causative agent for ASF, can spread very rapidly. African swine fever (ASF) is an enveloped DNA virus family. *Asfarviridae* and genus *Asfivirus*. There is only one serotype of ASFV. However, there are 16 genotypes and different strains. ASFV highly resistant to the environment especially in blood, excretion, pork and pork products such as sausage, ham etc. ASFV durable at low temperature for 3-6 months. It can be transmitted by direct contact with infected animals, indirect contact with fomites, and tick vectors and infected animals can become carriers for ASF. In order to detect a rapid sensitive and simple diagnostic method for on-site detection of ASFV is required. A recombinase polymerase amplification (RPA) was developed using a pair of specific primers and probe. The RPA detection could be accomplished in 10 to 15 min. RPA showed detection limit as real-time PCR, and there was no cross-reaction with other viral strains. A simple and rapid RPA detection method for control and investigation of ASFV protection. Also the RPA PCR is available in CX96 Real-time PCR and Rotor gene machines.

Introduction

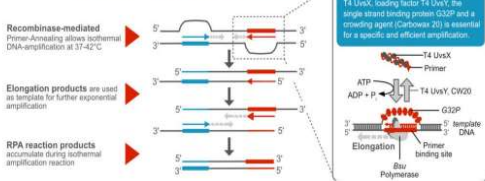
- African Swine Fever virus**
- African swine fever (ASF) is a highly contagious viral disease of swine which causes high mortality, approaching 100%, in domestic pigs;
- ASF is caused by a large, double stranded DNA virus, ASF virus (ASFV), which replicates predominantly in the cytoplasm of macrophages and is the only member of the *Asfarviridae* family, genus *Asfivirus*;
- The disease caused by this virus was first identified in Kenya in the 1920s;
- There are 24 genotypes and 9 serotypes of ASFV;
- In 2007, the disease spread again out of Africa into the Caucasus, especially Georgia, and in 2014 it reached the eastern territory of the European Union.
- Epidemiology**
- Vector- Wild Boars (in Africa – *Ornithodoros* ticks)
- Reservoir – Wild boars (in Africa - Warthogs)
- Transmission
 - By bite of infected ticks
 - Mainly by human activities



- Symptoms**
- Infection of domestic pigs leads to a lethal hemorrhagic fever for which there is no effective vaccine.
- ASF virus (ASFV), which replicates predominantly in the cytoplasm of macrophages



Mechanism of RPA



Results

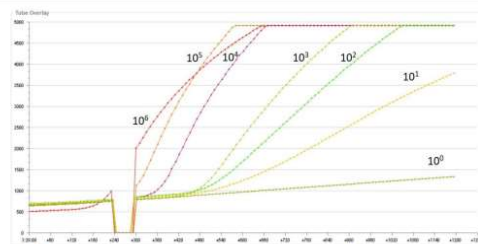


Fig 1. Amplification curves, which indicates increase of fluorescence over time. Numbers near curves indicates concentration of diluted samples.

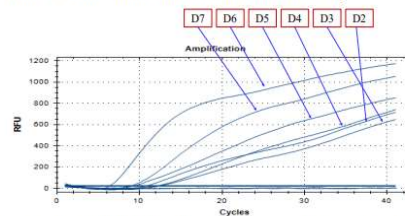


Fig 2. Amplification of ASFV samples by CF96 Real-Time PCR machine

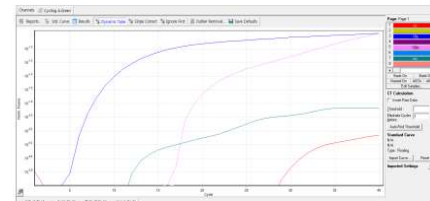


Fig 3. Amplification of ASFV samples by CF96 Rotor Gene PCR machine

Conclusions

- In this study, we developed a Real-time RPA method based on Exo probe for the rapid and sensitive detection of ASFV.
- Testing of developed method was performed on samples, which belongs to genotype 2, which is the most wide spread in different countries. (30 samples total).
- The detection limit of the Real- Time RPA was 5×10^1 copies.
- It is necessary to evaluate this method using wide range of clinical samples. Interpretations were limited by the small sample-size, but the results suggested that the developed RT-RPA performed well in ASFV detection.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Bio-industry Technology Development Program (grant No. 320071-02), the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs, Republic of Korea.

References

- Galindo I, Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*. 2017 May 10;9(5):103. doi: 10.3390/v905103. PMID: 28489063; PMCID: PMC5454416.
- Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Viruses*. 2019 Oct 2;2(1):197676. doi: 10.1016/j.virus.2019.197676. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31362027.
- Yoo D, Kim H, Lee JY, Yoo HS. African swine fever: Etiology, epidemiological status in Korea, and perspective on control. *J Vet Sci*. 2020 Mar;21(2):e38. doi: 10.4142/jvs.2020.21.e38. PMID: 32233141; PMCID: PMC7113569.
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombinase proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204. doi: 10.1371/journal.pbio.0040204. PMID: 16756388; PMCID: PMC1475771.

KMB 2022

49th Annual Meeting & International Symposium

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

2022 KMB Selected **Five Leading Technologies in Microbiology and Biotechnology**

June **22** (Wed)
— **24** (Fri)
2022

HICO
Gyeongju
Korea

CONTENTS

KMB Board	2
Organizing Committee	4
Conference Venue Information	6
Schedule	7
Plenary Lectures	9
Special Lecture	14
KMB Lecture	15
International Symposium	16
Symposium	20
Poster Session	45
2022 Bio-Exhibition	151
Author Index	159



Poster session

- J-22** **Development of Recombinant Viral Antigen for p205 From African Swine Fever Virus**
Junghun Kim¹, Jaewan Park¹, Zion Choi¹, Hakhyun Ka¹, Bo-Young Jeon², and Minsun Hong¹
¹*Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea,* ²*Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea*
- J-23** **Study for Recombinant Viral Antigen, EP402R, of African Swine Fever Virus**
Jaewan Park¹, Junghun Kim¹, Zion Choi¹, Hakhyun Ka¹, Bo-Young Jeon², and Minsun Hong¹
¹*Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea,* ²*Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea*
- J-24** **MEEckiEiR Suppresses AtSpic DeVmEitis viET2F-α/IF2-γ-IRduced IRfBmmEiSR iR daCap Cells**
Jae-Hoon Oh^{1,2}, Seung ho Kim^{1,2}, Hyung won Ryu², Ok-Kyoung Kwon², Sang-Bae Han¹, Ji-Won Park^{2,4}, and Kyung-Seop Ahn^{2,4}
¹*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28160, Republic of Korea,* ²*Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Chungbuk 28116, Republic of Korea*
- J-25** **Expression of SARS-CoV-2 Antigens on the Surface of Lactic Acid Bacteria for the Development of Oral Vaccine**
Inchan Hwang, Remilyn Mendoza, Jeong Min Yoo, Jae Seung Lee, and Dae-Kyung Kang^{*}
Department of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea
- J-26** **Design and Production of monoclonal Antibodies against Red Sea Bream iridovirus (RSB/)**
ByungDon Joo¹, Soo Bin Park¹, Jong Ho Lee¹, Hyoung Jun Kim², Tae Sung Jung³, and Ki Hwan Moon¹
¹*Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Republic of Korea,* ²*OIE Reference Laboratory for VHS, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea,* ³*Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea*
- J-27** **Analysis of the Potential of Exosomes Secreted from *Helicobacter pylori* Pulsed Dendritic Cells as Immunomodulators**
Myunghwan Jung^{1,2,3,4}, Seorin Park^{1,2}, Jong-Hun Ha^{1,2}, Jeong-H Shin^{1,2}, Jeong-gyu Choi^{1,2}, Kyu-Min Kim^{1,2}, Seung-Chul Baik^{1,4}, Hyung-Lyun Kang^{1,3,4}, Min-Kyoung Shin^{1,2,3,4}, and Woo-Kon Lee^{1,2,3,4}
¹*Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea,* ²*BK21 Center for Human Resource Development in the Bio-Health Industry, Department of Convergence Medical Science, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea,* ³*Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea,* ⁴*Institute of Health Science Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea*
- J-28** **The Novel Side Effects of Vaccines Detection Sensor with Electrocardiogram and Computer Aided Diagnostic Algorithm**
Jong-Ha Lee, Seok-min Hwang, and Jin-Chul Heo
Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Republic of Korea

KMB 2022

49th Annual Meeting & International Symposium

The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

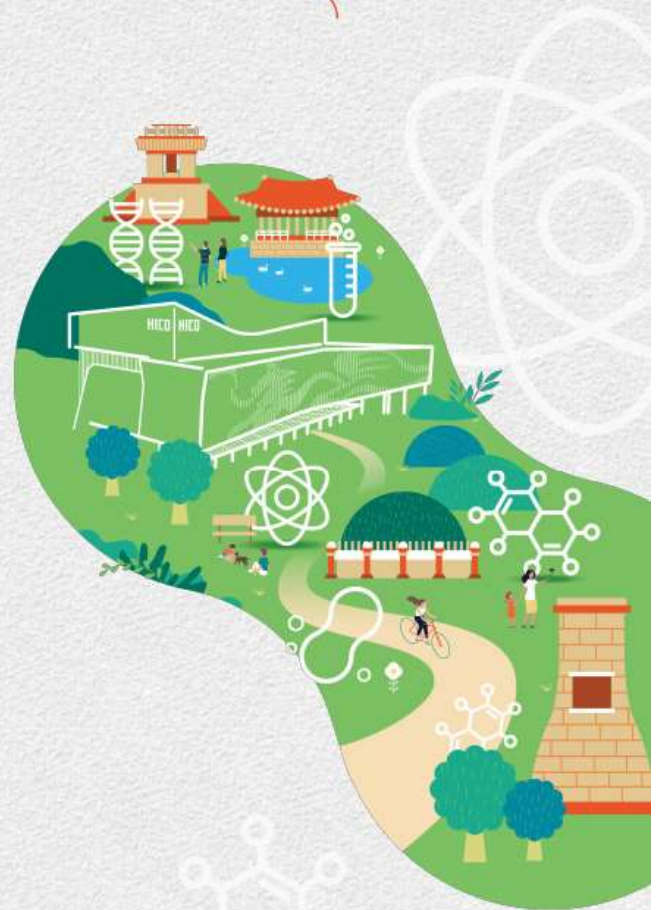
June **22** (Wed)
— **24** (Fri)
2022

2022 KMB Selected Five Leading Technologies in
Microbiology and Biotechnology

HICO
Gyeongju
Korea

CONTENTS

KMB Board	<u>2</u>
Organizing Committee	<u>4</u>
Conference Venue Information	<u>6</u>
Schedule	<u>7</u>
Plenary Lectures	<u>9</u>
Special Lecture	<u>14</u>
KMB Lecture	<u>15</u>
International Symposium	<u>16</u>
Symposium	<u>20</u>
Poster Session	<u>45</u>
2022 Bio-Exhibition	<u>151</u>
Author Index	<u>159</u>



Poster session

- J-22** **Development of Recombinant Viral Antigen for p205 From African Swine Fever Virus**
Junghun Kim¹, Jaewan Park^{1*}, Zion Choi^{1*}, dakhyun Ka^{1*}, Boluoung Jeon^{2*}, and Minsun dong^{1*}
¹Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea, ²Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea
- J-23** **Study for Recombinant Viral Antigen, EP402R, of African Swine Fever Virus**
Jaewan Park¹, Junghun Kim^{1*}, Zion Choi^{1*}, dakhyun Ka^{1*}, Boluoung Jeon^{2*}, and Minsun dong^{1*}
¹Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea, ²Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea
- J-24** **MEEckiEIR SuppVesses AtSpic DeVnEtitis viET2F-α/IF2-γ-IRduced IRfEmmEtisSRiR daCap Cells**
Jaekdoon Oh^{1,2*}, Seung ho Kim^{1,2}, dyung won Ryu², OkIKyoung Kwon², SangIBae dan¹, JilWon Park^{2*}, and KyungISeop Ahr^{2*}
¹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28160, Republic of Korea, ²Natural Medicine Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Chungbuk 28116, Republic of Korea
- J-25** **Expression of SARSiCoV2 Antigens on the Surface of Lactic Acid Bacteria for the Development of kral Vaccine**
anIdhan d wang, Remilyn Mendoza, Jeong Min uoo, Jae Seung Lee, and DaellKyung Kang^{*}
 Department of Animal Resources Science, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea
- J-26** **Design and Production of i monoclonal Antibodies against Red Sea Bream eridovirus (RS&V)**
ByungDon Joo¹, Soo Bin Park¹, Jong d o Lee¹, dyoung Jun Kim², Tae Sung Jung³, and Ki dwan Moon^{1*}
¹Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Republic of Korea, ²OIE Reference Laboratory for VHS, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea, ³Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea
- J-27** **Analysis of the Potential of Exosomes Secreted from *Helicobacter pylori*Pulsed Dendritic Cells as emmunomodulators**
Myunghwan Jung^{1,2,3,4}, Seorin Park^{1,2}, JongIdun da^{1,2}, JeongIih Shin^{1,2}, JeongIgyu Choi^{1,2}, KyulMin Kim^{1,2}, SeungIChul Baik^{1,4}, dyoungILyun Kang^{1,3,4}, MinIKyoung Shin^{1,2,3,4}, and WoolKon Lee^{1,2,3,4}
¹Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea, ²BK21 Center for Human Resource Development in the Bio-Health Industry, Department of Convergence Medical Science, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea, ³Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea, ⁴Institute of Health Science Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea
- J-28** **phe Novel Side Effects of Vaccines Detection Sensor with Electrocardiogram and ComputerAided Diagnostic Algorithm**
JongIda Lee, SeokImin d wang, and JiniChul d eo
 Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Republic of Korea



Development of Recombinant Viral Antigen for p205 from African Swine Fever Virus

Junghun Kim¹, Jaewan Park¹, Zion Choi¹, Hakhyun Ka¹, Bo-Young Jeon², and Minsun Hong^{1*}

¹Department of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju, Republic of Korea.

²Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju, Republic of Korea.

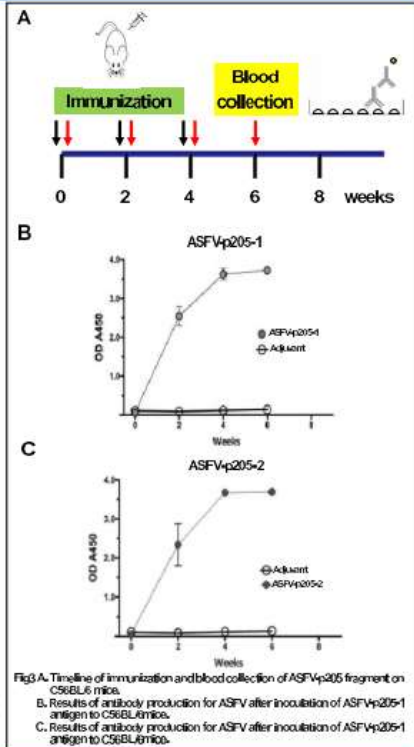
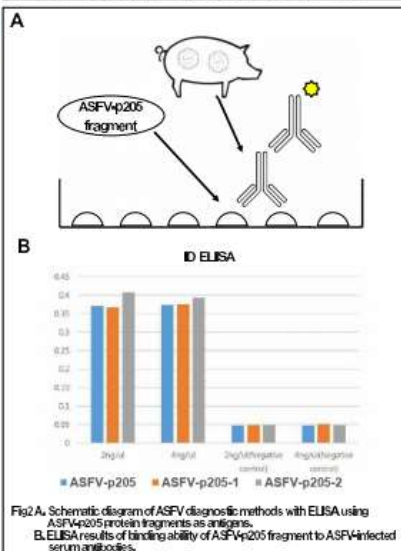
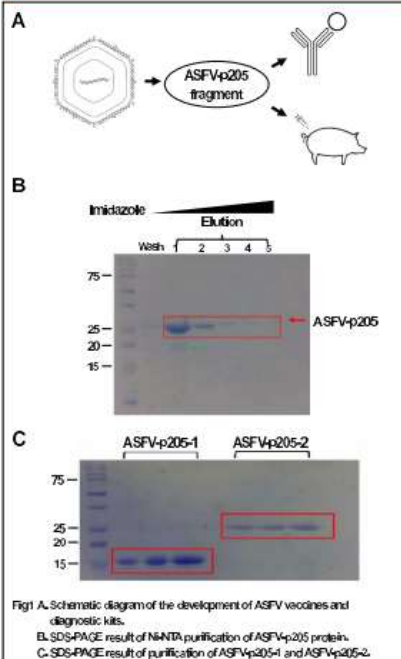
Abstract

African swine fever virus (ASFV) is DNA virus, belonging to the Asfarviridae family, and causes African swine fever (ASF). ASFV infection in pigs has no noticeable symptoms in early stages but is highly virulent with ~100% mortality rates in domestic pigs. Recent and frequent outbreaks of ASF have been reported in many countries including Korea. Despite the severity, there is no available vaccine for ASFV infection. Therefore, it is critical to perform a rapid diagnosis at an early stage of ASFV infection to prevent from further transmission and to reduce economic damages. However, ASFV diagnosis must be accurate since the false positive results cause to slaughter pigs in domestic farms. In this study, an ASFV antigen, ASFV-p205, was selected as an economical and effective candidate for diagnosis of ASFV infection. Recombinant technology was used to produce and purify the ASFV-p205. During studies, we experienced instability of a purified ASFV-p205 and screened to optimize the ASFV-p205 preparations. Finally, the ASFV-p205 succeeded to purify in pure and in stable form and proceeded to further applications for diagnosis and for vaccine designs.

Introduction

African swine fever is an infectious disease caused by the African swine fever virus belonging to the Asfarviridae, and the number of cases in Southeast Asia, including Korea, is increasing rapidly. It is a very serious disease socially and economically because the mortality rate reaches 100% in the event of African swine fever. Despite this seriousness, the number of structural proteins of the African swine fever virus is high and the size of the virus is large, making it difficult to induce effective immunity, so there is no commercialized vaccine so far. In addition, it is very important to rapid diagnose infections in pigs. Because when pigs get infected, they must be killed in the farm to control the infection. Accordingly, a diagnostic kit was developed to contain an ASFV-p205 protein antigen derived from the African swine fever virus and to use for the antigen as a vaccine candidate.

Results



Conclusion

- The yield and stability were evaluated for recombinant ASFV-p205 proteins into various fragments.
- ELISA using purified ASFV-p205 fragments and serum from pigs infected with ASFV confirmed high reactivity of the purified recombinant ASFV-p205 antigen.
- Immunization of the purified ASFV-p205 antigens ensure a potential use as subunit vaccine candidate against ASFV infection in pigs

Reference

- Arch. of Veterinary Pathology-47, 15-17, 2016.
- Immaculata Galindo and Covadonga Alonso. Viruses, 9, 103, 2017.
- Peters, J., Abrams, C., Hemez, B., Nicolaz, A., Escobedo, J.M., Dixon, L. and Atkins, C.J. Virus, 81, 202-2029, 2007.

Funding

- Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (15450-2869)
- Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea and funded by the Ministry of Education (2021R1A5A1A01000000-0A00)
- Eonil Korea 21





大韓獸醫學會誌

제63권 3호 부록

2023년 11월



(사)대한수의학회 2023년 추계국제학술대회 수의생명과학의 첨단기술 및 융합 Advanced Fusion and Technology of Veterinary Biomedical Research

- 일 시 : 2023년 11월 29일(수)~12월 2일(토)
- 장 소 : 제주국제컨벤션센터
- 주 최 : (사)대한수의학회
- 공동주관 : 경상국립대학교 산학협력단, 국가마우스표현형분석사업단(KMFC), 대한골발수의사회, 대한수의사회 재단형동물 감염병 특위, 미생물·전염병학 교수협의회 비교의학집현연구소(서울대 SRC), 서울대학교 수의과대학 BK21 FOUR 미래수의학선도교육연구단, 전남대학교 숙주표적 항바이러스 연구센터, 전북대학교 생체안전성연구소, Zoonosis 핵심연구지원센터, 제주대학교 수의과연구소, 제주대학교 자율운영중점연구소, 충남대학교 수의과대학 중점연구소, 충북대학교 반려동물중개의학임센터, (사)한국동물보건의사 대학교육협회, 한국말수의사회, 한국수의인문사회학회, 한국수의생리학회, 한국수의해부학회, 한국수의해부학회, 한국수의해부학회, 한국야생동물센터협의회, 전북대/충북대/제주대 야생동물 인력양성 특성화대학원, 한국양봉농협, 한국예방수의학회
- 후 원 : 제주특별자치도, 한국과학기술단체총연합회, 한국마사회, 베링가인젤하임동물약품(주), (주)바이오노트, 주식회사 티스팀
- 협 찬 : 오리엔트바이오, 미로펫, 쓰리사인, 씨에이치디, 셀레믹스, 케이원메드글로벌, 웅비메디텍, 드림테크, 필코리아테크놀로지

사단법인 대한수의학회 The Korean Society of Veterinary Science

*이 발표논문집은 정부재원(과학기술진흥기금 및 복권기금)으로 한국과학기술단체총연합회의 지원을 받아 발간되었음



P-039	The development of modified recombinant Stx2e toxoid expression system, and comparative evaluation of the modified toxoid with commercial vaccine in Korean piglets	155
	JeongHee Yu, YeongJu Yu, Jin Hur	
P-040	Isolation of <i>Clostridium perfringens</i> from pigs and meats, and its characteristics	155
	Jin Hur, Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu	
P-041	Disinfection effectiveness of hypochloride acid combined with ultraviolet light against airborne microbes with organic materials	156
	Hwa-Yong Lee, Hanbit Lee, Hyungjun Jeon	
P-042	Genetic characterization of canine astroviruses and suggest possibility of inter-species transmission between dogs and raccoon dogs in South Korea	156
	Su-Beom Chae, Chang-Gi Jeong, Young-Sun Sung, Sun-Young Kim, Kyoung-Ki Lee, Jae-Ku Oem	
P-043	Investigation of <i>Enterocytozoon bienusi</i> and <i>Encephalitozoon cuniculi</i> infection in domestic pigs ...	156
	Young-Sik Kim, Jun-Soo Park, Young-Sun Sung, Sun-Young Kim, Jae-Ku Oem	
P-044	The bacterial profiles associated with porcine meningitis	156
	Chang-Gi Jeong, Jun-Soo Park, Eun-Jee Na, Su-Beom Chae, Young-Sik Kim, Ah-Young Kim, Kyung-Hyun Lee, Jae-Ku Oem	
P-045	Genetic and biological characteristics of a new porcine epidemic diarrhea virus	157
	Dae-Min Kim, Sung Hyun Moon, Seung-Chai Kim, Ho-Seong Cho, Dongseob Tark	
P-046	Whole genome sequencing of African swine fever virus using target capture	157
	Boyoung Jeon, Sezim Monoldorova, Taesu Kwon, Soon Hwan Kwon, Sung Kyeong Lee, Sunho Park, Seungcheol Kim	
P-047	Immunogenicity of recombinant African swine fever virus antigens	157
	Sezim Monoldorova, Sunho Park, Hok Young Jung, Minsun Hong, Sung Kyeong Lee, Boyoung Jeon	
P-048	The Phylogenetic diversity of <i>Apodemus Agrarius</i> based on Cytb mitochondrial gene	157
	Sezim Monoldorova, In Yoing Lee, Sung Kyeong Lee, Sunho Park, Seongcheol Kim, Boyoung Jeon	
P-049	Prevalence and antimicrobial resistance profile of <i>Staphylococcus</i> spp. isolated from bovine mastitis milk samples in Korea, 2018-2022	158
	Hye Jeong Kang, Ju-Yeon You, Jin-San Moon, Ha-Young Kim, Soon-Seek Yoon, Hyun-Mi Kang	
P-050	Distribution of PrP ^{CWD} in tissues of CWD affected sika deer using RT-QuIC following experimental oral transmission	158
	Kyung-Je Park, Gordon Mitchell, Hoochang Park, Yu-Ran Lee, Hae-Eun Kang, Hyun Joo Sohn	
P-051	Alkaline hydrolysis of CWD infected tissue	158
	Kyung-Je Park, Hoochang Park, Yu-Ran Lee, Hae-Eun Kang, Hyun Joo Sohn	
P-052	Bovine spongiform encephalopathy surveillance in the Republic of Korea	158
	Hyun Joo Sohn, Yu-Ran Lee, Si Muk Lee, Kyung-Je Park, Hoochang Park, Hae-Eun Kang	

P-045

Genetic and biological characteristics of a new porcine epidemic diarrhea virus

Dae-Min Kim¹, Sung Hyun Moon², Seung-Chai Kim², Ho-Seong Cho², Dongseob Park^{1*}

¹Laboratory for Infectious Disease Prevention, Korea Zoonosis Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan 54531, Republic of Korea, ²College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan, Jeonbuk 54396, Republic of Korea

Porcine epidemic diarrhea (PED) had been annually reported since the first outbreak of PED in the United Kingdom in 1971, which identified from the Belgium in 1978. Until 2010, low-pathogenic strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) were emerged and circulated in several countries. In 2013, the outbreak of PED in the United States was observed and the virus with a highly virulence quickly spread neighboring countries. The PED caused considerable economic losses in the swine livestock industry, causing watery diarrhea, vomiting, anorexia, and dehydration. The PEDV was divided into group 1 (G1) and 2 (G2) according to genetic diverseness and the G2 were currently circulated in the Republic of Korea. Although the commercial vaccines were existed available, the efficacy of the vaccines is controversial due to its limitations on genetic mutation and induction of mucosal immune response. Thus, in order to improve the above problems, a new vaccine must be developed. In November 2019, PEDV was isolated from the weaned piglets suffering diarrhea in the Republic of Korea. And the whole genome of the virus was analyzed by next-generation sequencing (NGS) and a new strain was designated by CKK1-1. As a result of phylogenetic analysis, the virus belongs to genotype 2 and build a novel clade. Subsequently, the virus was passaged to develop vaccine candidate with medium complemented with bile acid up to 180 passages. The virus was observed by unique biological characteristics such as cell detachment and cell lysis but not syncytia as well as recorded by high titer (more than 10^{6.0} median tissue culture infectious dose per mL). And the virus was evaluated for pathogenicity by 5-day-old piglets. Interestingly, the parent strain of CKK1-1 showed low virulence and the piglets were orally administered with 180 passaged CKK1-1 were determined that they observed 100% (survival rate without clinical symptoms such as diarrhea and vomiting). These results demonstrated that the new strain, CKK1-1, was successfully attenuated by culture condition with bile acid and will become the effective vaccine candidate. Also, our results would help to understand the relationship between genetic mutation and pathogenicity.

P-046

Whole genome sequencing of African swine fever virus using target capture

Boyoung Jeon^{1*}, Sezin Monoklorova¹, Taesu Kwon², Soon Hwan Kwon³, Sung Kyeong Lee¹, Sunho Park¹, Seungcheol Kim¹

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Cloud 9, ³Department of Infectious Diseases, Armed Forces Medical Research Institute, Daejeon, Korea, ⁴Institute for Immunology and Immunological diseases, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

African swine fever (ASF) is a contagious viral disease of pigs, causing enormous economic damage. Since the first outbreak in South Korea in 2019, ASF outbreaks have continued. To facilitate control, it is important to understand the genotypes and phylogenetic relationships of ASF viruses. To analyze the whole genome of the ASFV isolates, the ASFV genome was analyzed using the whole genome sequencing method and hybrid capture sequencing using an ASFV-specific probe. The genome-wide sequencing for ASFV showed significant agreement between the two sequencing methods, especially at low concentrations or when there was contamination of cultured host cells. It was found to be useful to analyze the ASFV genome using hybrid capture sequencing using specific probes.

P-047

Immunogenicity of recombinant African swine fever virus antigens

Sezin Monoklorova¹, Sunho Park¹, Huk Young Jung², Minsun Hong³, Sung Kyeong Lee¹, Boyoung Jeon^{1*}

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Research and Development Center, HONGCHEONCTVAC Co., Ltd, Hongcheon, Korea, ³Division of Biological science and Technology, Yonsei University

African swine fever (ASF) is a fatal pig disease that threatens the global pig industry. There is a lack of commercially available vaccines for ASF, so an effective vaccine would be a true breakthrough.

In this study, *E. coli* was used to express and purify a recombinant fusion protein combining the ASF viral proteins p30 and CD2v. Purified recombinant p30 and CD2v expressed alone or fused were used as controls. Humoral and cellular immunity induced by the protein was evaluated in mice, and then the immune response was evaluated in pigs.

Cytokines including antigen-specific IgG responses, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α were measured. Our results suggest that it has excellent immunostimulatory activity and immunogenicity in mice and may be a suitable candidate for inducing immune responses in pigs.

P-048

The Phylogenetic diversity of Apodemus Agrarius based on Cytb mitochondrial gene

Sezin Monoklorova¹, In Yoing Lee², Sung Kyeong Lee¹, Sunho Park¹, Seungcheol Kim¹, Boyoung Jeon^{1*}

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Department of Tropical Medicine, Yonsei University, Korea, ³Institute of Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University

The striped field mouse *Apodemus agrarius* is distributed from Eastern Europe to the Russian Far East, including Korean Peninsula and China, and is the most common rodent in Korea. Three hundred and nine *A. agrarius* were collected in nine provinces and 32 sites in Korea using Sherman traps with peanut butter-sketched crackers. The mitochondrial genes of *A. agrarius*, Cytb and ND1 were used to analysis of phylogenetic diversity of *A. agrarius* collected in Korea. One hundred seventy-eight Cytb and ND1 sequences were obtained and used for the phylogenetic diversity of *A. agrarius*. In the present study, diverse haplotypes were discovered including new haplotypes. These results would be helpful in investigation of diversity of striped field mouse living in Korea and rodent-borne diseases.



Whole genome sequencing of African swine fever virus using target capture

Sezim Monoldorova¹, Taesu Kwon², Soon-Hwan Kwon³, Sungkyeong Lee¹, Sunho Park, Sungcheol Kim, Bo-Young Jeon^{1,*}

¹ College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea; ² Cloud 9, Cheongju, Korea; ³ Department of Infectious diseases, Armed Forces Medical Research Institute, Daejeon, Korea

Abstract

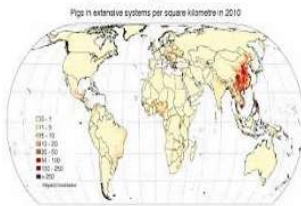
African swine fever (ASF) is a contagious viral disease of pigs, causing enormous economic damage. Since the first outbreak in South Korea in 2019, ASF outbreaks have continued. To facilitate control, it is important to understand the genotypes and phylogenetic relationships of ASF viruses. To analyze the whole genome of the ASFV isolates, the ASFV genome was analyzed using the whole genome sequencing method and hybrid capture sequencing using an ASFV-specific probe. The genome-wide sequencing for ASFV showed significant agreement between the two sequencing methods, especially at low concentrations or when there was contamination of cultured host cells, it was found to be useful to analyze the ASFV genome using hybrid capture sequencing using specific probes.

Key words: African swine fever virus, whole genome sequencing, capture probe-based sequencing.

Introduction

African swine fever (ASF) is a DNA virus in the Asfviridae Family; genus Asfavirus and is the sole member of its Family. ASFV is a large, icosahedral, double-stranded DNA virus with a linear genome of 189 kilobases containing more than 180 genes. It replicates in the cytoplasm of infected cells and is the only known virus with a double-stranded DNA genome to be transmitted by arthropods. ASFV causes a hemorrhagic fever high mortality rates in pigs. ASFV occurs through transmission cycles involving domestic pigs and wild boars (in regions of Asia, Europe and Africa), wild African suids (warthogs, bush pigs, giant forest hogs), and soft ticks (genus Ornithodoros) which act as a reservoirs and vector (OIE, 2018). In these wild hosts, infection is generally asymptomatic. ASFV does not cause disease in humans.

Epidemiology

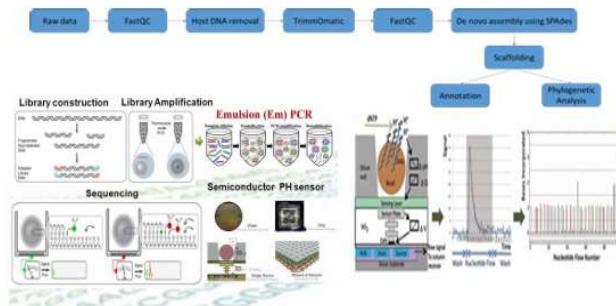


Scheme of ASF transmission



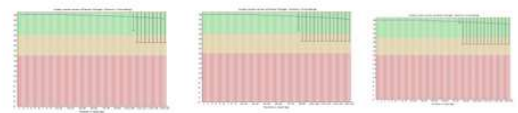
<https://www.wur.nl/en/research-results/research-institutes/biovetinary-research/animal-diseases>

Methods



Results

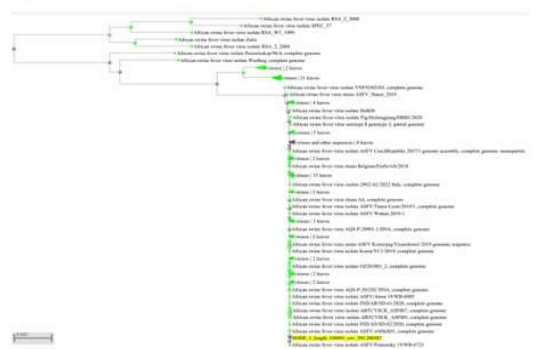
#	ID	Reads(before QC)	Reads(after QC)	Contigs	N50	Library
1	SSXL-0368-14-AFSV_1.IonXpress_001	5,353,542	4,662,749	217		
2	SSXL-0368-14-AFSV_1.IonXpress_003	5,464,713	Not Passed			
3	SSXL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_001	2,715,601	2,412,110	8		
4	SSXL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_002	2,793,805	2,475,815	786		
5	SSXL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_003	2,741,046	2,470,731	9		
6	SSXL-0368-15-ASFV_2.IonXpress_004	2,683,482	2,397,587	282		



Distribution of the top 36 Blast Hits on 3 subject sequences



Distribution of the top 38 Blast Hits on 5 subject sequences



Conclusions

Whole genome sequencing of African swine fever virus using capture probe was very useful to perform whole genome sequencing of ASFV isolates.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Bio-industry Advanced Technology Development Program (grant no. 122011-02), the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs, Republic of Korea.

References

- Galindo I, Alonso C (2017) African swine fever virus: a review. *Viruses* 9
- Dixon, L.K.; Chapman, D.A.G.; Netherton, C.L.; Upton, C. African Swine Fever Virus Replication and Genomics.
- Forth JH, Forth LF, Blome S, Hoyer D, Beer M (2020) African swine fever whole-genome sequencing: quantity wanted but quality needed. *PLoS Pathog* 16(8): e1008779
- Okwasimire, Rodney, Joseph F. Flint, Edrine B. Kayaga, Steven Lakin, Jim Pierce, Roger W. Barrette, Bonto Faburay, Dickson Ndoboli, John E. Ekakoro, Eddie M. Wampande, and et al. 2023. "Whole Genome Sequencing Shows that African Swine Fever Virus Genotype IX Is Still Circulating in Domestic Pigs in All Regions of Uganda"



大韓獸醫學會誌

제63권 3호 부록

2023년 11월



(사)대한수의학회 2023년 추계국제학술대회

수의생명과학의 첨단기술 및 융합

Advanced Fusion and Technology of
Veterinary Biomedical Research

- 일 시 : 2023년 11월 29일(수)~12월 2일(토)
- 장 소 : 제주국제컨벤션센터
- 주 최 : (사)대한수의학회
- 공동주관 : 경상국립대학교 산학협력단, 국가마우스표현형분석사업단(MMPC), 대한꿀벌수의사회, 대한수의사회 재난행동물 감염병 특위, 미생물·전염병학 교수협의회, 비교의학질환연구센터(서울대 SRC), 서울대학교 수의과대학 BK21 FOUR 미래수의학선도교육연구단, 전남대학교 숙주표적 항바이러스 연구센터, 전북대학교 생체안전상연구소, Zoonosis 핵심연구지원센터, 제주대학교 수의과학연구소, 제주대학교 자율운영중점연구소, 충남대학교 수의과대학 중점연구소, 충북대학교 반려동물중개의학임상센터, (사)한국동물보건사 대학교육협회, 한국말수의사회, 한국수의인문사회학회, 한국수의생리학협회, 한국수의해부학회, 한국수의행의학연구회, 한국야생동물센터협의회, 전북대/충북대/제주대 야생동물 인문양성 특성화대학원, 한국양봉농협, 한국예방수의학회
- 후 원 : 제주특별자치도, 한국과학기술단체총연합회, 한국마사회, 배양가인겔하임동물약품㈜, 주비아오노트, 주식회사 티스팀
- 협 찬 : 오리엔트바이오, 미로렛, 쓰리사인, 싸에이치디, 셀레믹스, 케어원메드글로벌, 웅비메디텍, 드림테크, 필코라이테크, 놀로지

사단법인 대한수의학회

The Korean Society of Veterinary Science

“이 발표논문집은 정부재원(과학기술진흥기금 및 복권기금)으로 한국과학기술단체총연합회의 지원을 받아 발간되었습니다”

- P-039 The development of modified recombinant Sb2e toxoid expression system, and comparative evaluation of the modified toxoid with commercial vaccine in Korean piglets 155
Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu, Jin Hur
- P-040 Isolation of *Clostridium perfringens* from pigs and meats, and its characteristics 155
Jin Hur, Jeong Hee Yu, Yeong Ju Yu
- P-041 Disinfection effectiveness of hypochloride acid combined with ultraviolet light against airborne microbes with organic materials 156
Hwa-Yong Lee, Hanbit Lee, Hyungjun Jeon
- P-042 Genetic characterization of canine astroviruses and suggest possibility of inter-species transmission between dogs and raccoon dogs in South Korea 156
Su-Beom Chae, Chang-Gi Jeong, Young-Sun Sung, Sun-Young Kim, Kyoung-Ki Lee, Jae-Ku Oem
- P-043 Investigation of *Enterocytozoon bienusi* and *Encephalitozoon cuniculi* infection in domestic pigs ... 156
Young-Sik Kim, Jun-Soo Park, Young-Sun Sung, Sun-Young Kim, Jae-Ku Oem
- P-044 The bacterial profiles associated with porcine meningitis 156
Chang-Gi Jeong, Jun-Soo Park, Eun-Jee Na, Su-Beom Chae, Young-Sik Kim, Ah-Young Kim, Kyung-Hyun Lee, Jae-Ku Oem
- P-045 Genetic and biological characteristics of a new porcine epidemic diarrhea virus 157
Dae-Min Kim, Sung Hyun Moon, Seung-Chai Kim, Ho-Seong Cho, Dongseob Tark
- P-046 Whole genome sequencing of African swine fever virus using target capture 157
Boyoung Jeon, Sezim Monokdorova, Taesu Kwon, Soon Hwan Kwon, Sung Kyeong Lee, Sunho Park, Seungcheol Kim
- P-047 Immunogenicity of recombinant African swine fever virus antigens 157
Sezim Monokdorova, Sunho Park, Hok Young Jung, Minsun Hong, Sung Kyeong Lee, Boyoung Jeon
- P-048 The Phylogenetic diversity of *Apodemus Agrarius* based on Cytb mitochondrial gene 157
Sezim Monokdorova, In Yoing Lee, Sung Kyeong Lee, Sunho Park, Seungcheol Kim, Boyoung Jeon
- P-049 Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis milk samples in Korea, 2018–2022 158
Hye Jeong Kang, Ju-Yeon You, Jin-San Moon, Ha-Young Kim, Soon-Seek Yoon, Hyun-Mi Kang
- P-050 Distribution of Pr^{P^{CWD}} in tissues of CWD affected sika deer using RT-QuIC following experimental oral transmission 158
Kyung-Je Park, Gordon Mitchell, Hoochang Park, Yu-Ran Lee, Hae-Eun Kang, Hyun Joo Sohn
- P-051 Alkaline hydrolysis of CWD infected tissue 158
Kyung-Je Park, Hoochang Park, Yu-Ran Lee, Hae-Eun Kang, Hyun Joo Sohn
- P-052 Bovine spongiform encephalopathy surveillance in the Republic of Korea 158
Hyun Joo Sohn, Yu-Ran Lee, Si Muk Lee, Kyung-Je Park, Hoochang Park, Hae-Eun Kang

P-045

Genetic and biological characteristics of a new porcine epidemic diarrhea virus

Dae-Min Kim¹, Song Hyun Moon², Seung-Chai Kim², Ho-Seong Cho², Dongseob Park^{3*}

¹Laboratory for Infectious Disease Prevention, Korea Zoonosis Research Institute, Jeonbuk National University, Icheon 56531, Republic of Korea, ²College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, 79 Gokseong, Iisan, Jeonbuk 54596, Republic of Korea

Porcine epidemic diarrhea (PED) had been annually reported since the first outbreak of PED in the United Kingdom in 1971, which identified from the Belgium in 1978. Until 2010, low-pathogenic strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) were emerged and circulated in several countries. In 2013, the outbreak of PED in the United States was observed and the virus with a highly virulence quickly spread neighboring countries. The PED caused considerable economic losses in the swine livestock industry, causing watery diarrhea, vomiting, anorexia, and dehydration. The PEDV was divided into group 1 (G1) and 2 (G2) according to genetic diversities and the G2 were currently circulated in the Republic of Korea. Although the commercial vaccines were existed available, the efficacy of the vaccines is controversial due to its limitations on genetic mutation and induction of mucosal immune response. Thus, in order to improve the above problems, a new vaccine must be developed. In November 2019, PEDV was isolated from the weaned piglets suffering diarrhea in the Republic of Korea. And the whole genome of the virus was analyzed by next-generation sequencing (NGS) and a new strain was designated by CKKI-1. As a result of phylogenetic analysis, the virus belongs to geno group 2 and build a novel clade. Subsequently, the virus was passaged to develop vaccine candidate with medium complemented with bile acid up to 180 passages. The virus was observed by unique biological characteristics such as cell detachment and cell lysis but not syncytia as well as recorded by high titer (more than 10¹⁰ median tissue culture infectious dose per mL). And the virus was evaluated for pathogenicity by 5-day-old piglets. Interestingly, the parent strain of CKKI-1 showed low virulence and the piglets were orally administered with 180 passaged CKKI-1 were determined that they observed 100% survival rate without clinical symptoms such as diarrhea and vomiting. These results demonstrated that the new strain, CKKI-1, was successfully attenuated by culture condition with bile acid and will become the effective vaccine candidate. Also, our results would help to understand the relationship between genetic mutation and pathogenicity.

P-046

Whole genome sequencing of African swine fever virus using target capture

Boyoung Jeon^{1*}, Sezim Monoldorova¹, Taesu Kwon², Soon Hwan Kwon³, Sung Kyeong Lee¹, Sunho Park¹, Seungcheol Kim¹

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Class 9, Department of Infectious diseases, Armed Forces Medical Research Institute, Daejeon, Korea, ³Institute for Immunology and Immunological diseases, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

African swine fever (ASF) is a contagious viral disease of pigs, causing enormous economic damage. Since the first outbreak in South Korea in 2019, ASF outbreaks have continued. To facilitate control, it is important to understand the genotypes and phylogenetic relationships of ASF viruses. To analyze the whole genome of the ASFV isolates, the ASFV genome was analyzed using the whole genome sequencing method and hybrid capture sequencing using an ASFV-specific probe. The genome-wide sequencing for ASFV showed significant agreement between the two sequencing methods, especially at low concentrations or when there was contamination of cultured host cells. It was found to be useful to analyze the ASFV genome using hybrid capture sequencing using specific probes.

P-047

Immunogenicity of recombinant African swine fever virus antigens

Sezim Monoldorova¹, Sunho Park¹, Hok Young Jung², Minsoo Hong³, Sung Kyeong Lee¹, Boyoung Jeon^{1*}

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Research and Development Center, HONGCHEON CTCVAC Co., Ltd, Hongcheon, Korea, ³Division of Biological science and Technology, Yonsei University

African swine fever (ASF) is a fatal pig disease that threatens the global pig industry. There is a lack of commercially available vaccines for ASF, so an effective vaccine would be a true breakthrough.

In the study, *E. coli* was used to express and purify a recombinant fusion protein combining the ASF viral proteins p30 and CD2v. Purified recombinant p30 and CD2v expressed alone or fused were used as controls. Humoral and cellular immunity induced by the protein was evaluated in mice, and then the immune response was evaluated in pigs.

Cytokines including antigen-specific IgG responses, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α were measured. Our results suggest that it has excellent immunostimulatory activity and immunogenicity in mice and may be a suitable candidate for inducing immune responses in pigs.

P-048

The Phylogenetic diversity of Apodemus Agrarius based on Cytb mitochondrial gene

Sezim Monoldorova¹, In Young Lee², Sung Kyeong Lee¹, Sunho Park¹, Seungcheol Kim¹, Boyoung Jeon^{1*}

¹College of Software Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju, Korea, ²Department of Tropical Medicine, Yonsei University, Korea, ³Institute of Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University

The striped field mouse *Apodemus agrarius* is distributed from Eastern Europe to the Russian Far East, including Korean Peninsula and China, and is the most common rodent in Korea. Three hundred and nine *A. agrarius* were collected in nine provinces and 32 sites in Korea using Sherman traps with peanut butter-slathered crackers. The mitochondrial genes of *A. agrarius*, Cytb and ND1 were used to analysis of phylogenetic diversity of *A. agrarius* collected in Korea. One hundred seventy-eight Cytb and ND1 sequences were obtained and used for the phylogenetic diversity of *A. agrarius*. In the present study, diverse haplotypes were discovered including new haplotypes. These results would be helpful in investigation of diversity of striped field mouse living in Korea and rodent-borne diseases.

<연구성과 3> (특허출원 1/2건)

22. 4. 25. 오후 5:26

특허로

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.04.25
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(NP220007)
출원번호 10-2022-0050971 (접수번호 1-1-2022-0443998-05)
(DAS접근코드2C8A)
출원인명칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
대리인성명 이희숙(9-2002-000221-5)
발명자성명 홍민선 전보영 박재완
발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도

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

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2023.12.29
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(NP230094)
출원번호 10-2023-0197779 (접수번호 1-1-2023-1479487-21)
(DAS접근코드A192)
출원인명칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
대리인성명 이희숙(9-2002-000221-5)
발명자성명 전보영
발명의명칭 차세대염기서열분석법을 이용한 아프리카돼지열병 바이러스 검출방법 및 전장 유전체 염기서열분석방법

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>

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ ASFV 전장유전체 분석용 분리주 확보(러시아 국립수의과학연구소 협력)	○ ASFV 전장유전체 분석을 위하여 국내 발생 ASFV Paju주와 아프리카 등을 포함한 전세계에서 분리된 ASFV주를 러시아 국립수의과학연구소의 협력을 통하여 확보함	○ 100%
○ ASFV 전장유전체 NGS 시퀀싱 방법 확립	○ ASFV 전장유전체 시퀀싱을 위하여 shot gun 방식과 capture probe 방식을 통하여 시퀀싱 방법을 확립함	○ 100%
○ ASFV 전장유전체 NGS 시퀀싱 방법 개발	○ ASFV 전장유전체를 효과적으로 시퀀싱할 수 있는 AmpliSeq 차세대시퀀싱방법을 최초로 개발함	○ 100%
○ ASFV 전장유전체 시퀀싱 데이터 생산	○ ASFV 국내 주 및 아프리카 등 분리주에 대한 전장유전체 시퀀싱을 통해 데이터 생산	○ 100%
○ ASFV 전장유전체 시퀀스에 대한 유전자 annotation	○ WGS 시퀀싱한 ASFV 전장유전체에 대한 유전자 annotation을 실시하여 병원성, 진단 마커 등 분석함	○ 100%
○ ASFV 전장유전체 시퀀싱 DB 구축	○ ASFV WGS DB 시스템 확립	○ 100%
○ ASFV 유전체 기반 ASFV 단백질 발현	○ 식물기반 ASFV 재조합단백질 발현시스템 구축 및 발현	○ 90%
○ ASF 방어면역유도 마커를 이용한 DNA 백신 후보 제작	○ ASFV P30, P72, CD2v 발현 DNA 백신 제작	○ 100%
○ ASFV 유전체 기반 진단법 개발	○ ASFV 유전체 기반 real-time PCR 개발 및 임상검체를 이용한 유효성 평가 ○ ASFV 유전체 기반 LAMP 등온증폭법 개발 ○ ASFV 유전체 기반 real-time RPA 개발 및 임상검체를 이용한 유효성 평가	○ 100% ○ 100% ○ 100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

1) 연구개발성과의 활용방안

- 본 연구과제를 통해 개발된 아프리카돼지열병바이러스에 대한 전장유전체 시퀀싱 방법인 AmpliSeq은 ASFV에 대한 경제적이고 효율적인 차세대시퀀싱을 이용한 전장유전체시퀀싱 방법으로, 국내·국외에서 발생하는 ASFV 전장유전체를 시퀀싱함으로써 전 세계의 ASFV 유전형 및 변이를 효과적으로 분석할 수 있음.
- ASFV 표준실험실에 사용하게 된다면, ASFV에 대한 검출 뿐만 아니라 세포배양을 통하지 않고도 ASFV 전장유전체를 쉽게 할 수 있게 됨으로써 효율적인 ASFV 전장유전체 데이터베이스를 구축할 수 있음
- 본 연구과제를 통해 아프리카돼지열병에 대한 실험실 진단법인 real-time PCR, ELISA 등 진단키트를 개발하여 현장적용성이 뛰어나며 방역에 활용될 수 있음
- 아프리카돼지열병에 대한 등온증폭검사법, ELISA, ICT를 개발하는 데 기여하여 신속하게 감별 스크리닝 및 대응 가능
- 진단의 국산화로 고가의 수입 진단제를 대체하여 비용절감하고, 국산 진단기기의 수출로 외화 이익 창출 효과
- 본 연구과제에서 개발된 차세대시퀀싱기술을 돼지나 소 등 다른 가축의 럼피스킨병 등의 바이러스에 대한 전장유전체 시퀀싱에 활용할 수 있음
- 본 연구과제에서 아프리카돼지열병에 대한 진단법을 개발하기 위하여 사용된 RPA와 CRISPR 기술을 통해 다른 가축의 감염병을 신속·정확하게 진단할 수 있는 진단법을 개발하는 데 활용될 수 있음
- 아프리카돼지열병바이러스의 진단 및 백신 마커로 발굴한 타겟을 백신 후보물질을 발굴하고 활용하여 아프리카돼지열병에 대한 백신 개발 및 감별법에 활용될 수 있음
- 아프리카 돼지열병과 유사 증상 및 유사 바이러스 질환인 돼지열병 등과 같은 여러 질환을 현장에서 신속하게 감별하여 국내 유입 및 확산을 예방하는 데 기여할 수 있음
- 개발된 아프리카돼지열병바이러스에 대한 차세대시퀀싱기술을 이용한 전장유전체시퀀싱, 등온증폭검사법의 사업화를 통하여 부가가치 창출, 아프리카돼지열병에 대한 조기진단을 통한 확산방지를 통하여 가축 농가를 포함한 국가 경제적 피해를 미연에 방지하는 데 기여할 수 있음
- 본 연구개발은 아프리카돼지열병 바이러스에 대한 NGS기반 유전체 분석을 통해, 아프리카 돼지열병바이러스의 유래, 시간적 및 지역적 이동 특성 규명에 활용
- 유전자 데이터베이스 구축을 통해 돼지 및 멧돼지의 아프리카돼지열병 발생 대응 및 관리 대책 수립의 과학적 근거 제공
- 아프리카돼지열병 빅데이터 분석기반 아프리카돼지열병 발생 상시 감시체계 시스템 제공
- 아프리카돼지열병 돼지 발생에 대한 상시 감시체계 시스템 제공
- 진단 및 백신 개발에 핵심적인 신변종 예측 및 감염력 예측 기술이며, 향후 출현할 신변종 바이러스에 대응할 수 있는 백신/치료제 개발을 가속할 수 있는 원천기술을 확보할 수 있음
- 본 연구개발에서 구축할 통합분석 플랫폼을 활용하여 현재 전 세계적으로 유행하고 있는 변종 대유행 가능성을 예측하고 감염력을 객관적인 수치와 실험 결과로 검증하여 신변종 바이러스의 변이-감염력 데이터베이스를 구축하고 백신/치료제 개발 등에 활용할 수 있음

2) 연구개발성과의 기대효과

- 기술적, 사회적 측면
 - 아프리카돼지열병 genome 유전체 데이터 생산을 위한 표준 Protocol 제시

- 아프리카돼지열병 유전체 빅데이터 분석 파이프라인 제시
 - 아프리카돼지열병 임상검체에서 유전체분석을 위한 처리방법 제시
 - 아프리카돼지열병 바이러스 유전체 데이터베이스 구축을 통한 관련 분야 지식의 증진에 기여
 - 신·변종 감염병에 대한 진단·백신 물질 발굴을 위한 원천기술 확보 및 미래 감염병 대응/대비 기술 선점
 - 본 연구개발을 통하여 진단/백신 개발 기술을 혁신적으로 발전시키고, 선진국과의 기술격차를 줄임으로써 선진국 의존적인 기술의 한계를 극복할 수 있음
 - 본 연구개발을 통해 기술 개발에 필요한 전문인력을 양성하여 우리나라의 전반적인 기술 수준을 높일 수 있음
 - 본 연구개발을 통해 신종 감염병에 빠르게 대처함으로써 국민의 생명과 보건 안보를 지키고 우리나라의 국제적 위상을 높일 수 있음
- 경제적·산업적 측면
- 아프리카돼지열병에 대한 정밀분석을 통한 조속한 초동대처로 농가 피해의 경제적 비용 감소
 - 민감한 현장진단 기술개발을 통한 부가가치 창출
 - 본 연구개발을 통해 구축한 플랫폼을 이용해 신속한 감염병 진단/백신 개발로 수입 대체 효과 및 해외 수출 증진
 - 본 연구개발을 통해 신속하고 최적화된 유전체분석 파이프라인을 구축하게 되고 국내기업과의 협력을 통해 우리나라의 기술 수준을 높일 수 있음

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 연구개발성과의 사업화 계획

(1) 사업화 전략

- 가. 본 사업을 통해 아프리카돼지열병 신속진단 키트 및 항체 ELISA 키트를 제품화할 예정이다.
- 나. 지적재산권 회피 방안을 검토하여 국내기술의 독점우위를 확보 예정.
- 다. 본 연구과제의 사업화를 위하여 획득한 지식재산권 2건 (아프리카돼지열병바이러스에 대한 신기술을 적용한 차세대염기서열분석법, 아프리카돼지열병 융합단백질을 이용한 진단 및 백신활용)에 대해 협의 중인 기업과 기술이전을 실시하여 사업화를 진행할 계획임
- 라. 해외 아프리카돼지열병 진단 키트와의 비교 분석 결과를 통한 진단의 신속도, 민감도, 정확도 제시
- 라. 아프리카돼지열병 real-time PCR 키트 제품화
 - 아프리카돼지열병 특이 유전자에 대한 프라이머 및 프로브를 이용하여 real-time PCR을 개발하여 시제품을 제작함.
 - 러시아 Federal Research Center of Virology & Microbiology (바이러스 및 미생물 연방 연구소)에서 수집한 바이러스와 감염동물 유래 임상검체 및 국내 아프리카돼지열병바이러스를 이용하여 국제표준으로 사용하고 있는 제품을 이용하여 유효성 검증함.
 - 농림축산검역본부에 임상시험계획서 승인 후 품목허가 임상시험 진행하여 제품등록을 실시하고자 함.
 - 사업화를 위해 원재료 관리, 제품화 생산, 정도관리, 판매대리점 등 생산 및 사업화를 위한 준비하여 본 사업화 과제를 통해 품목허가 승인 후 사업화 진행 예정.

마. 아프리카돼지열병 백신 시제품 실용화

- 아프리카돼지열병에 대한 재조합융합항원과 면역보조제를 이용한 서브유닛 백신과 세포 면역을 유도하는 플라스미드 DNA 백신을 개발하였고, 또한 시제품을 제작하여 제품의 일반적인 특성 및 안전성을 평가하였음.
- 제작된 아프리카돼지열병백신 시제품을 이용하여 목적동물인 돼지에 접종하여 백신의 안전성 및 면역반응을 평가하여 세포면역을 잘 유도함을 확인하였음
- 러시아의 국제적인 관계로 인하여 러시아 Federal Research Center of Virology & Microbiology (바이러스 및 미생물 연방 연구소)를 통한 공격접종을 통한 방어실험을 수행하기 어려웠음. 공격접종을 통한 백신시제품의 방어능을 평가하기 위하여 현재 농림축산검역본부에서 진행하고 있는 아프리카돼지열병바이러스 전용 3등급 동물실이 설립되면, 검출역본부와 협의하여 추진하고자 함.
- 아프리카돼지열병바이스백신에 대한 가이드라인이 확립되지 않았지만, 최근 농림축산검역본부에서 수행한 아프리카돼지열병에 대한 백신가이드라인 용역과제 내용을 따라 품목 허가를 위한 시험을 실시하고자 함.

(2) 생산 계획

- 중소기업벤처부 지원 사업을 통해 아프리카돼지열병 신속진단 키트 및 아프리카돼지열병 real-time PCR 키트 상품의 생산

(3) 해외시장 진출 계획

- 러시아 국립수의과학연구소와 본 연구에서 제품화한 아프리카돼지열병 신속 진단 키트 및 아프리카돼지열병 real-time PCR 키트 유용성 분석 결과 공유를 통해 해외시장 내에서 신뢰성 확인

■ 중국 시장 진출 계획

(가) 시장 분석

- 중국은 정부주도로 산학과 연계해서 진단키트 개발과 차단방역을 진행 중이나 현지 검사 물량에 대한 진단키트 공급율이 약 10%에 불과하기 때문에 진단키트에 대한 수요가 높음.
- 아프리카돼지열병 발병과 미중 무역 분쟁으로 돼지고기 공급량이 급감하여 돼지고기 시장 가격 폭등 등 돼지고기 수급의 사회적 문제가 발생하고 있어 수급안정화를 위해 Backyard 사육시설에 비해 기업형 대량 사육시설에 대한 차단방역에 역량을 집중하고 있음.
- 중국 내 진단키트 공급율이 낮아 대량 검사 시스템과 항체진단을 통한 폐사 전 사전 방역검사 수요가 발생.

(나) 판매 및 마케팅 전략

- KOTRA 및 중소기업진흥공단 지원 사업을 통한 시장 진입에 대한 추가정보를 확보하고 이를 통한 마케팅 전략 수립.
- 수립된 마케팅 전략을 토대로 산학연공동법인의 중국현지 법인을 거점으로 현지 판매 네트워크를 활용한 시장 진입 모색.
- 중국의 자국 제품 사용 정책으로 현지 법인을 통한 중국제품으로 출시 방안 모색.
- 현지 법인을 통해 현지 임상연구 논문 발표로 제품 판매 명분 확보.
- 검사 자동화 도입 및 공급금액 조정을 통한 시장 친화적 마케팅 전략 수립.

○ 동남아시아 시장 진출 계획

(가) 시장 분석

- 동남아시아의 경우 고전적인 backyard 사육방식과 발병 시 차단방역 시스템 부재로 인해 급속도로 전파되고 있으며, 인접 국가들로 지속적으로 전파가 진행되고 있음.
- 예산 문제로 진단을 기초로 한 차단방역이 정상적으로 이루어지지 않고 있음.

- 중국에 비해 비교적 진입장벽이 낮아 시장 진입이 용이할 것으로 판단됨.
- (나) 판매 및 마케팅 전략
- 진단이 활성화 될 수 있도록 공급금액을 현지 수준에 맞추는 가격 전략 수립.

(4) 사업화에 따른 기대효과

가. 매출 이익 증대

나. 국내외 양돈 산업에서 심각한 위협이 되는 아프리카돼지열병 바이러스 감염에 신속하게 대처 가능한 신속 진단키트의 원료 및 제품의 국내화 및 국제적 우위 확보

다. 기술 연구 개발 과정 및 제품화 과정에서 고용 창출 유발

< 연구개발성과 활용계획표 >

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

주 의

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