

122059-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)
가축질병대응기술고도화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004649-01

야생철새 전파
조류인플루엔자 및
루엔자 및
파라믹소
바이러스
조기검출
시스템
개발 및
국제공동
감시체계
구축

최
종
보
고
서

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

야생철새 전파 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 조기검출시스템 개발 및 국제공동감시체계 구축

2024.06.18

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

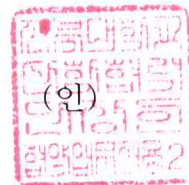
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “야생철새 전파 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 조기검출시스템 개발 및 국제공동감시체계 구축”(개발기간 : 2022.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2024.06.18

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자)



주관연구책임자 : 장형관

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

| 최종보고서 | | | | 보안등급 | | | | |
|-------------------------|---------------|-------------------|---|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------|----------------|
| | | | | 일반[√], 보안[] | | | | |
| 중앙행정기관명 | 농림축산식품부 | | | 사업명 | 가축질병대응기술 고도화지원사업 | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | 농림식품기술기획평가원 | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | 국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축 | | | |
| 공고번호 | 제 농축 2022-99호 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | | |
| | | | | 연구개발과제번호 | 122059-2 | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0710 동물 질병예방 | 50% | LB0704 수의 미생물/기생생물 | 30% | LC0499 달리 분류되지 않는 치료/진단기기 | 20% | |
| | 농림식품과학기술분류 | RB0201 동물질병관리 | 50% | PA0302 축산물 위생·안전 | 30% | RB0299 기타 수의예방 | 20% | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | 국문 | | | | | | |
| | | 영문 | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 국문 | 야생철새 전파 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 조기검출 시스템 개발 및 국제 공동감시체계 구축 | | | | | |
| | | 영문 | Development of an early detection system for AI and APMV spread by wild migratory birds and establishment of an international joint monitoring system | | | | | |
| 주관연구개발기관 | | 기관명 | 전북대학교 산학협력단 | 사업자등록번호 | 402-82-15272 | | | |
| | | 주소 | (우)54896 전북 전주시 덕진구 백제대로 567 | 법인등록번호 | 210171-0005625 | | | |
| 연구책임자 | | 성명 | 장형관 | 직위 | 교수 | | | |
| | | 연락처 | 직장전화 전자우편 | 휴대전화 | 국가연구자번호 10103834 | | | |
| 연구개발기간 | | 전체 | 2022. 04. 01 - 2023. 12. 31(1년 9개월) | | | | | |
| | | 1단계 | 1년차 | 2022. 04. 01 - 2022. 12. 31(9개월) | | | | |
| | | | 2년차 | 2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(12개월) | | | | |
| 연구개발비 (단위: 천원) | 정부지원 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | 그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타() | | | | 합계 | 연구개발 비외 지원금 |
| | 현금 | 현금 현물 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 현금 현물 합계 | |
| 총계 | 977,000 | | | | | | 977,000 977,000 | |
| 1단계 | 1년차 | 419,000 | | | | | 419,000 419,000 | |
| | 2년차 | 558,000 | | | | | 558,000 558,000 | |
| 공동연구개발기관 등 (해당 시 작성) | | 기관명 | 책임자 | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 | |
| | | 일본 CADIC | Tamaki Okabayashi | 부센터장 | | | 역할 | 기관유형 |
| 공동연구개발기관 | | | | | | | 공동 | 대학 |
| 연구개발담당자 실무담당자 | | 성명 | 강민 | | 직위 | | 부교수 | |
| | | 연락처 | 직장전화 | | 휴대전화 | | | |
| | | | 전자우편 | | 국가연구자번호 | | 11078414 | |

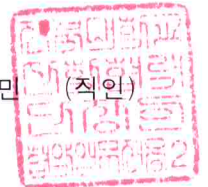
이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 2 월 29 일

주관연구책임자: 장 형 관



주관연구개발기관의 장:전북대학교 산학협력단장 손 정 민 (직인)



농림축산식품부장관 · 농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

| | | | | | | | |
|------------------------|------------------|---|--|-----------------------|-----|---------------------------------|-----|
| 사업명 | | 가축질병대응기술고도화지원사업 | | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | | 국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축 | | | | 연구개발과제번호 122059-2 | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0710 동물 질병예방 | 50% | LB0704 수의 미생물/기생생물 | 30% | LC0499 달리 분류되지 않는 치료/진단기기 | 20% |
| | 농림식품 과학기술분류 | RB0201 동물질병관리 | 50% | PA0302 축산물 위생·안전 | 30% | RB0299 기타 수의예방 | 20% |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 야생철새 전파 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 조기검출시스템 개발 및 국제 공동감시체계 구축 | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | | 2022. 04. 01. ~ 2023. 12. 31 (1년 9개월) | | | | | |
| 총 연구개발비 | | 총 977,000천원 (정부지원연구개발비 : 977,000천원) | | | | | |
| 연구개발단계 | | 기초[] 응용[V] 개발[] 기타[] | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준() 종료시점 목표() | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | - | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | - | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | | 야생조류 매개 주요 바이러스질병의 조기검출시스템을 개발하고 이를 기반으로한 국제 공동감시시스템 구축 | | | | |
| | 전체 내용 | | <ol style="list-style-type: none"> 1. 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발 및 현장실증 <ul style="list-style-type: none"> - 고품질 샘플 확보 체계 확립 - 바이러스 농축기술 확립 - 고효율 다중진단 AI Rapid kit 개발 - 조기검출시스템 현장실증 2. 야생철새 전파 바이러스질병 국제 공동감시시스템 구축 (한-일 중심의 동아시아권) <ul style="list-style-type: none"> - 한-일 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 모니터링 - 유전체 전장 분석을 통한 특성연구(분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명) - 분리주 위험도 평가 - GeneBank(유전자데이터 DB) 구축 3. 국제협력 시스템 구축 4. 방역시스템 개선 정책제안 | | | | |
| | 1단계 (해당 시 작성) | 목표 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발 및 현장실증 2. 야생철새 전파 바이러스질병 국제 공동감시시스템 구축 (한-일 중심의 동아시아권) 3. 국제협력 시스템 구축 4. 방역시스템 개선 정책제안 | | | | |
| | 내용 | 1. 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발 및 현장실증 <ol style="list-style-type: none"> 1) 고품질 샘플 확보 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> 가. 드론을 이용한 수중 샘플링법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 철새 밀집 수중지역에서 직접 샘플링 가능한 기술 확립 나. 휴대용 모바일 qPCR을 이용한 고품질 샘플 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 휴대용 모바일 qPCR(PicoGene)을 이용한 현장에서 미토콘드리아 시토크롬 C(CO1) 유전자를 다량 함유한 고품질 | | | | | |

| | | |
|--|--|--|
| | | <p>샘플 선별</p> <p>2) 바이러스 농축기술 확립 - 닭적혈구(cRBC) 응집반응법, 한외여과법(Ultrafiltration), 필터흡착법, 침전법(PEG, BaSO4)을 비교평가하여 바이러스를 안정적으로 고농축시킬 수 있는 바이러스 농축기술 최적화</p> <p>3) 고효율 다중진단 AI Rapid kit 개발 가. 조류인플루엔자 바이러스의 H5, H7, H9 아형 단일클론항체 제작 나. H5, H7, H9 아형 면역크로마토그래피 현장진단 키트 개발</p> <p>4) 조기검출시스템 현장실증 가. 대상질병 : 조류인플루엔자(AI), 파라믹소바이러스(APMV) 나. 대상동물 : 야생조류, 가금농장 다. 평가방법 : 기존 모니터링 시스템 대비 조기검출시스템의 신속정확성 평가</p> <p>2, 야생철새 전파 바이러스질병 국제 공동감시시스템 구축 (한-일 중심의 동아시아권)</p> <p>1) 한-일 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 모니터링 가. 국내의 야생조류 및 가금농장 질병 모니터링 - 대상질병 : 조류인플루엔자(AI), 파라믹소바이러스(APMV) - 대상동물 : 야생조류, 가금농장 - 모니터링 방법 : 항원진단 나. 일본에서의 질병 모니터링 - 대상질병 : 조류인플루엔자(AI), 파라믹소바이러스(APMV) - 대상동물 : 야생조류 - 모니터링 방법 : 항원진단 다. 모니터링 기술 체계화 - 검체 채취방법, 진단법, 병원체 분리동정법 - 모니터링 체계 최적화</p> <p>2) 유전체 전장 분석을 통한 특성연구 (분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명) 가. 유전체 전장분석 - 분자역학 분석 - 바이러스 진화 규명</p> <p>3) 분리주 위험도 평가 가. 야생조류 종, 지역별 위해요소 분석 - 확인된 바이러스 유전자 간 및 국내외 분리주와의 염기서열 비교 분석 나. 전파위험도 평가 - 근접한 시기에 인접지역에서 분리된 병원체간의 분자역학 관계 구명 다. 유전체 돌연변이의 위해요소 분석(유전체 재편성과 재조합) 라. 핵심 아미노산의 분석(병원성, 숙주 특이성 등)</p> <p>4) GenBank(유전자데이터 DB) 구축 가. GenBank 유전자원 데이터베이스(NCBI, BioProject) 구축 - 확보한 바이러스 유전자 정보를 NIBI의 Bio Project에 등록</p> |
|--|--|--|

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | 3. 국제협력 시스템 구축 가. 국제 정기 세미나(분기별) 나. 국제 학회 참여 및 연구논문 공동 발표(매년) 다. 연구자와 교수 방문 연구(매년 1개월 이상) 라. 교환학생 제도(한-일 공동 교육프로그램 개발) 4. 방역시스템 개선 정책제안 가. 조기진단시스템을 활용한 방역시스템 개선방안 정책제안 나. Si예찰 및 방역프로그램 정책제안 |
|--|--|--|--|

| | |
|--------|---|
| 연구개발성과 | 1. 한·일 공동연구를 통한 주요 가금질병 진단기술 및 질병 모니터링 확립 - 국내 및 일본의 조류인플루엔자(AIV) 및 파라믹소바이러스(APMV) 모니터링 - 야생철새 전파 바이러스 조기검출 시스템 개발 - 고효율 멀티진단 AI Rapid kit 개발 - AIV 및 APMV 모니터링 기술 체계화 - 분리주 위험도 평가 및 유전체 전장분석을 통한 특성연구 2. 한·일 기술/자원교류를 통한 원천기술 확보 - 드론을 이용한 환경수 샘플링, 모바일 qPCR 샘플링 기술 교류 - 환경수중 바이러스 농축기법 확립 - 생물 유전자원 교류 3. 한·일 인프라 협력을 통한 동아시아 연구 HUB 구축 - 연구기관 간 MOU 협약 체결 - 연구자 유치 및 파견(각 2회 총 4회) - 양국 연구기관 간 단기연수 프로그램 운영 - 해외 전문가 인력 POOL 구축 - 기기 공동 활용 4. 한·일 공동 연구성과 활용 및 산업화 추진 - 개발기술 기반 특허출원 - 국제 심포지엄 및 세미나 워크숍 개최 - 국제 학술대회 발표 등 |
|--------|---|

| | |
|---------------------|---|
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | 1. GeneBank구축으로 국내 진단, 백신 및 치료제 개발을 위한 핵심 유전자원 확보 2. 신변종 바이러스질병 초기 유입 및 전파에 선제적 대응으로 피해 최소화 3. 한-일 상시 공동연구 시스템 구축으로 동아시아 지역 포괄하는 공동 가축방역 체계 구축 기반 마련 및 국제적 영향력 제고 |
|---------------------|---|

| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화합물 | 신품종 | |
|-----------------------|---------------------|----------|---------------------|----------|-----------------|-----------|---------------------|-----------|--------------------|-----|-----|----|
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 |
| | 1 | 1 | 1 | | | | | 5 | | | | |
| 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) | 국제 협력 | | 감시 체계 | | 조류인플루엔자 | | 조류파라믹소 바이러스 | | 협력 시스템 | | | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | International joint | | Surveillance system | | Avian influenza | | Avian Paramyxovirus | | Cooperation system | | | |

〈 목 차 〉

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 01 |
| 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 | 02 |
| 1) 1차년도 연구수행과정 및 내용 | 04 |
| 2) 2차년도 연구수행과정 및 내용 | 12 |
| 3. 연구개발과제 수행결과 | 14 |
| 1) 1차년도 연구결과 | 14 |
| 2) 2차년도 연구결과 | 26 |
| 5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 | 37 |
| 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 | 37 |

1. 연구개발과제의 개요

| 구분 (연도) | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|---|--|
| 1차 년도 (2022) | 한-일 조류인플루엔자(AI) 및 파라믹소 바이러스(APMV) 모니터링 | <input type="checkbox"/> 국내의 야생조류 및 가금농장 질병 모니터링 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 조류인플루엔자 real time PCR 진단법 개발 및 모니터링 - 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정 * Matrix protein 타겟 작성 - 프라이머 작성 및 조건 설정 ○ 파라믹소바이러스 진단법 개발 및 모니터링 - 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정 * L protein 타겟 작성 |
| | | <input type="checkbox"/> 일본 야생조류에 대한 질병 모니터링 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 지역 : 미야자키현 철새도래지(니츠타치 조정지, 미이케) ○ 검출결과 1(11/7 채취) - 철새 분변 159개 검체, 환경수 3개 검체 채취 - 90개 검체 대상 계란시험 실시 - 4개 검체 HA검사 양성 - FluA 신속진단키트 결과 모두 음성 - 4개 검체 파라믹소바이러스 공통 Primer로 PCR 실시 - NGS 해석으로 바이러스 동정 예정 ○ 검출결과 2(11/21 채취) - 69개 검체 계란시험 실시 |
| | | <input type="checkbox"/> 모니터링 기술 체계화 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 조류인플루엔자 모니터링법 확립 ○ 파라믹소바이러스 모니터링법 확립 |
| | 유전체 전장 분석을 통한 특성연구 (분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명) | <input type="checkbox"/> 유전체 전장 분석 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 파라믹소바이러스 유전체 전장 및 분자역학 분석 - 파라믹소바이러스 유전체 전장 분석을 통한 APMV-1 class I으로 계통수 분석 수행 - 파라믹소바이러스 유전체 전장 분석을 통한 APMV-1 class II으로 계통수 분석 수행 ○ 인플루엔자바이러스 유전체 전장 분석 및 분자역학 분석 - H4N6의 HA 유전자가 Eurasian Type II에 속함 확인 - H4N6의 NA 유전자가 Eurasian Type I에 속함 확인 |

| | | | |
|-------------------------|--|---|---|
| | | | <ul style="list-style-type: none"> - H4N6 HA, NA 유전자가 Eurasian Type I, II이 recombination된 확인 - H5 HA 유전체를 분석하였을 때 clade 2.3.4.4b로 확인 - 현재 프랑스, 네덜란드, 미국, 일본 등 전 세계에 전파되어 있는 것으로 확인 - 여러종의 야생조류를 감염시키는 것으로 확인 |
| 분리주 위험도 평가 | | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 야생조류 종별, 지역별 위험요소 분석 및 전파위험도 평가 <input type="checkbox"/> 유전체 돌연변이의 위험요소 분석 <input type="checkbox"/> 핵심 아미노산 분석 (병원성, 숙주 특이성 등) | <ul style="list-style-type: none"> ○ APMV-13 야생철새 분리주 위험도 분석 - APMV-13형은 이전에 일본, 우크라이나, 카자흐스탄, 중국의 야생철새에서 분리되었으나, 국내에서는 처음으로 분리됨 - 기러기의 이동경로가 해당 국가들을 경유하기 때문에 기러기가 APMV를 전파하는 잠재적인 숙주로서 평가됨 |
| 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발 | | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 고품질 샘플 확보체계 확립 <input type="checkbox"/> 환경수중의 바이러스 농축기술 확립 <input type="checkbox"/> 고효율 멀티진단 AI Rapid kit 개발 | <ul style="list-style-type: none"> ○ (휴대용) 모바일 qPCR 이용한 고품질 샘플 선별 - CO1 유전자 영역을 정렬 및 Primers / Probe 영역 결정 ○ 환경수중의 바이러스 농축기술 확립 - 환경수 농축에 PEG 침전법을 이용, 100배 농축 성공 - RT-PCR에 의한 검출 감도 농축 효과 미확인 - 향후 닭 적혈구를 이용한 농축법 확립 ○ 고효율 멀티진단 AI Rapid kit 개발 - H5/H7/H9 아형에 대한 모노클론 항체제작 위해 Epitope 영역 탐색 - H5아형 아미노산 잔기 107-127 및 158-170 영역이 중요 Epitope로 밝혀짐 |

| | | | |
|-------------|---------------------------|--|--|
| | GenBank(유전자데이터 DB) 구축 | <input type="checkbox"/> GenBank 유전자원 DB(NCBI, BioProject) 구축 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 데이터베이스 공유 - 일본 유래 APMV 1주 교류 - 상호 유전자 정보공유로 역학연구 등 활용 - 확보한 AIV 5주 기탁 - 확보된 동물 유래 바이러스 유전자 정보 NIBI 등록 - 별도의 데이터관리 및 시스템 없이 기존 시스템을 활용함으로 데이터의 안정적 공공화 |
| 2차년도 (2023) | 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 현장실증 | <input type="checkbox"/> 실험실내 유효성검증 <input type="checkbox"/> 신규 조기진단기술 현장실증 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 드론을 이용한 환경수 샘플링법 확립 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 1회 비행으로 최소 1L 환경수 회수 ○ qPCR을 이용한 고품질 샘플 선별 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 현장에서 바로 진단 및 양성시료 검출 ○ 모바일 qPCR 이용한 진단 ○ 물시료 농축을 통한 진단 민감도 향상 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 당사슬결합 나노입자 활용 및 토양성분 활용 |
| | 국제협력 시스템 구축 | <input type="checkbox"/> AI, APMV 연구 및 진단기술 분석을 위한 정기적인 국제협력세미나 실시 <input type="checkbox"/> AI, APMV 연구 및 진단기술 분야 전문성 강화를 위한 국제학술대회 및 연구논문 공동발표 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 국제공동연구 활성화를 위한 전북대 조류질병연구소 CADIC 간 MOU 협약 체결 ○ 연구자 유치 및 파견(각 2회, 총 4회) ○ 한일 양국 단기연수 프로그램 운영 ○ 해외 전문가 인력 POOL 구축 ○ 한·일 연구장비 공동활용 ○ 개발 기술 기반의 특허 출원 ○ 공동 세미나 및 워크숍 ○ 연구 결과 공동활용 |

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1차년도

야생철새 전파 바이러스질병 모니터링 및 조기검출시스템 개발

□ 한-일 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 모니터링

- 국내의 야생조류 및 가금농장 질병 모니터링
 - 대상질병: 조류인플루엔자(AI), 조류파라믹소바이러스(APMV)
 - 기간: 2022.04 ~ 2023.10 까지
 - 진단방법: 항원진단
 - 수집샘플: 야생조류의 Feces, 사육 가금의 Trachea, CT

<Table Sampling plan for domestic poultry>

| Type | Age (Week) | Flock No | Sample type | | Sample No |
|------|------------|-----------|---------------------------|-------------|-----------|
| P | 1 / 3 | 30 flocks | Mortality/ symptomatic | Trachea, CT | 10/flock |

<Table Sampling plan for wild bird>

| Year | Location | Wild bird(Sample No.) | Sample type |
|-------|--------------------------|-----------------------|-------------|
| 2022 | Major wild bird habitats | >200 | Feces |
| 2023 | | >200 | |
| Total | >10 | >400 | |


- 지역: 주요 야생조류 서식지 및 가금농장
 - 충남, 충북, 전남, 전북, 경기 등 국내 주요 야생철새 도래지 및 가금농장 밀집 지역



<국내 오리 및 야생조류 채취지역 현황>

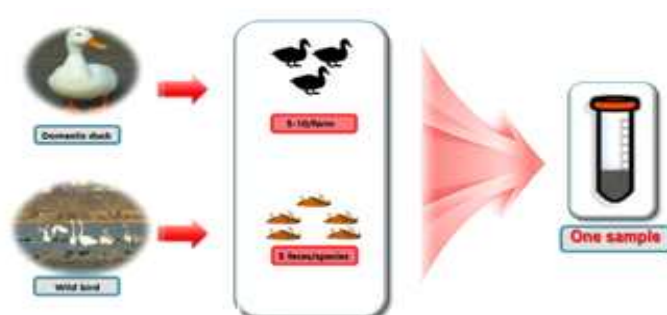
○ 일본의 야생조류에 대한 질병 모니터링

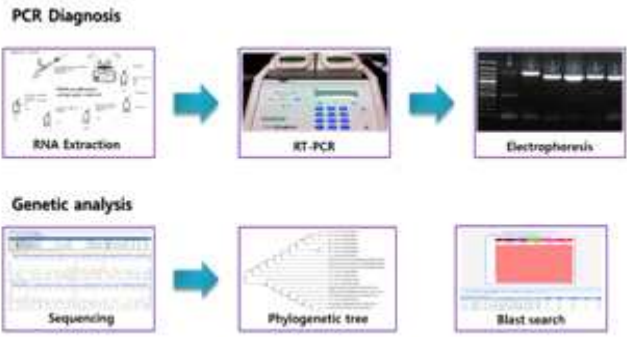

- 대상질병: 조류인플루엔자(AI), 조류파라믹소바이러스(APMV)
- 기간: 2022.04 ~ 2023.10 까지
- 진단방법: 항원진단
- 수집샘플: 야생조류 분변, 서식지 환경수 등
- 지역: 야생철새 도래지인 미이케(Miike), 사도와라마치(Sadowara) 니츠타치 조정지 및 연오카시(Nobeoka) 유우치가와, 미야자키시(Miyazaki-city)

| <Sampling plan for wild bird> | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|---|
| Year | Location | Wild bird habit (Sample NO.) | Wild bird feces (Sample NO.) | Sample type |  |
| 2022 | Major wild bird habitats | >100 | >100 | Faces and water | |
| 2023 | | >100 | >100 | | |
| Total | >5 | >200 | >200 | | |

○ 모니터링 기술 체계화

- 검체 채취방법, 진단법, 병원체 분리동정법
- 모니터링 체계 최적화
 - 샘플링 시료의 전처리 과정을 통해 발육계란 접종
 - 발육계란의 장노액 회수 및 적혈구응집(HA) 시험으로 바이러스 분리의 가부 판정
 - 분리 바이러스의 핵산 추출 후 RT-PCR법에 의해 HA 및 NA 아형 결정
 - H5, H7 아과 일 경우 HA 단백질의 절단 부위의 염기 서열을 해석하여 HPAI 판별
 - HA시험에 의해 양성인 경우, RT-PCR법을 통한 AI 음성의 검체는, 다양한 파라믹소 바이러스가 의심됨에 따라, MiSeq System을 사용하여 전체 게놈 해석 실시 및 바이러스 동정 시도
 - 바이러스가 분리 된 야생 배설물의 게놈 추출 및 숙주의 시토크롬 c 유전자의 염기 서열을 통해 조류종 규명, 위험종 여부 판단

| No | Sortation | Main contents |
|----|--|--|
| 1 | Diagnosis of flowchart (pooling samples) |  |

| | | |
|---|--|--|
| 2 | Diagnosis of flowchart (Diagnosis & genetic analysis) |  |
| 3 | Isolation flowchart |  |

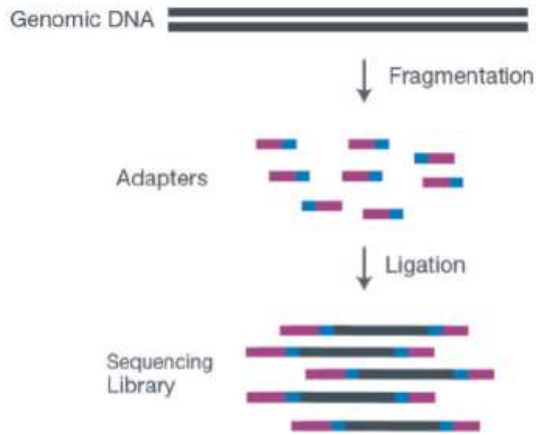
□ 유전체 전장 분석을 통한 특성연구(분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명)

○ 유전체 전장 분석

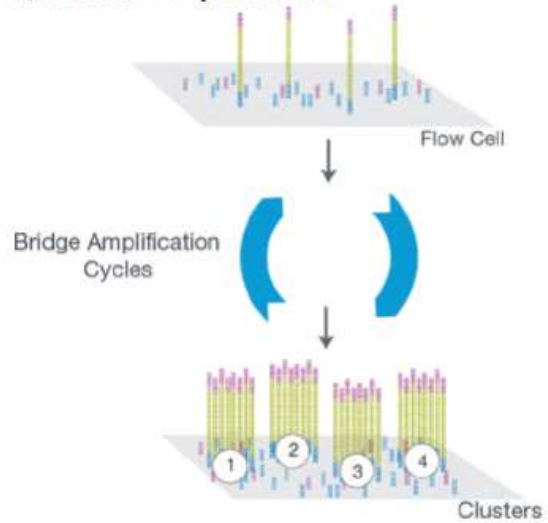
■ 분자역학 분석

- 확보된 조류 파리믹소바이러스 및 조류인플루엔자바이러스 중 분석할 바이러스 선정, 분석 바이러스에 대한 Library 구축 Nextra®XT DNA Library kit를 사용한 Multi-segment RT-PCR법으로 유전자산물 생산
- 유전자산물의 단일 가닥 DNA로 제작 및 조각을 내어 말단에 double stranded linker(adapter)를 부착
- Cluster amplification
 - * Flow cell 하단의 adapter 서열에 상보적인 DNA 고정되어 있으므로 adapter가 붙어 있는 library는 flow cell에 부착됨
 - * PCR 과정을 통해 단일가닥의 library를 주형으로 이중의 DNA를 얻음
 - * 주형으로 사용된 library는 제거되고 복제된 단일 가닥 DNA는 flow cell의 adapter와 결합되어 bridge를 형성함
 - * PCR 과정을 통해 단일 가닥의 DNA를 주형으로 이중 가닥의 DNA가 증폭되며 이러한 과정이 반복되어 clonal cluster를 생성함
- Sequencing
 - * 이중 가닥의 DNA 중 한쪽 가닥을 이용하여 염기의 종류에 따라 각각 다른 빛을 내는 형광물질이 결합된 dNTP를 사용하여 DNA polymerase에 의해 한 염기씩 합성될 때 마다 형광물질을 분석하여 염기서열을 생산함
- Alignment and data analysis
 - * Library에 따라 생성된 수많은 염기서열은 bio-informatics software(CLC workbench 등)를 이용하여 reference 염기서열을 기준으로 alignment를 수행하여 최종 유전자 정보 생산

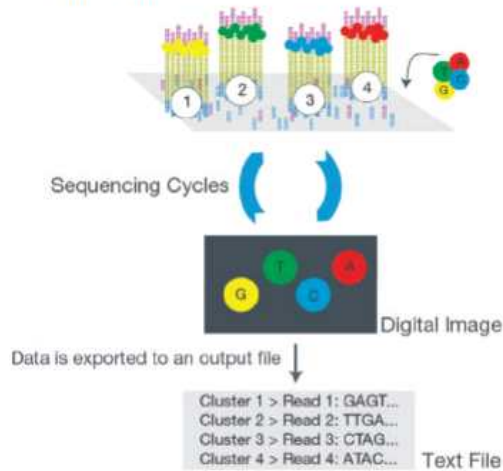
A. Library Preparation



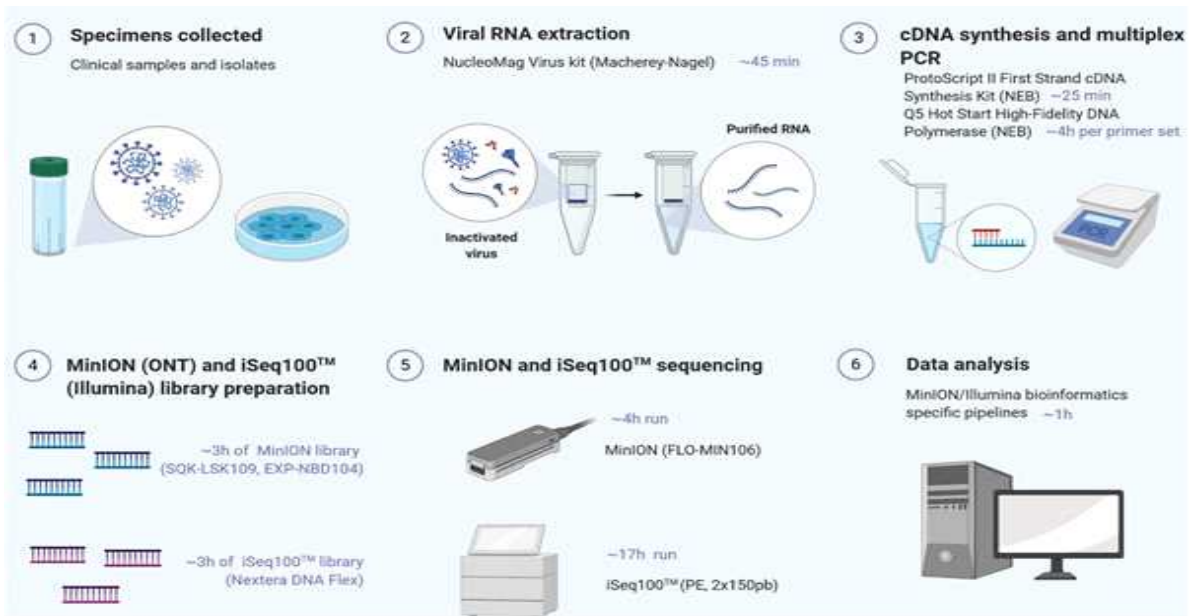
B. Cluster Amplification



C. Sequencing

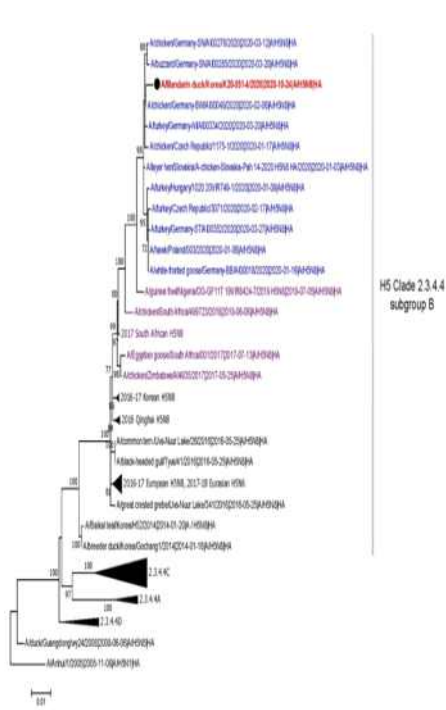


D. Alignment and Data Analysis

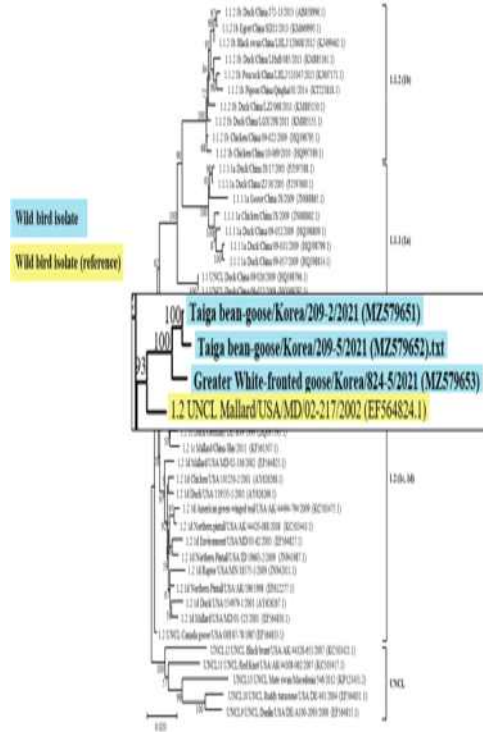


<전장 분석을 위한 NGS 모식도>

- 전장 염기서열 분석 및 계통 수 분석



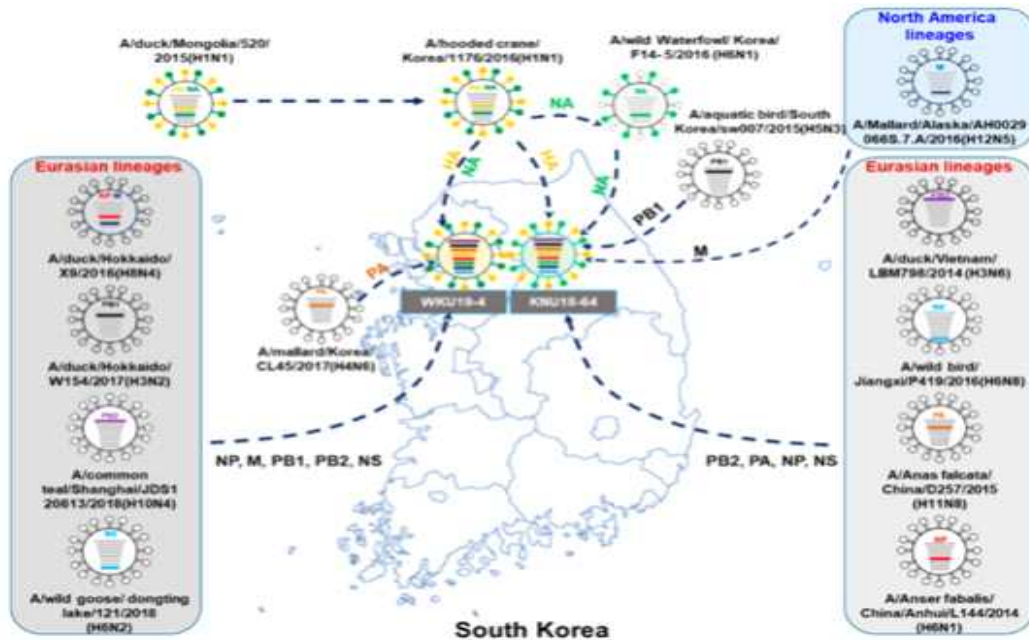
<조류인플루엔자 바이러스 계통수 분석>



<파라믹소바이러스 계통수 분석>

■ 바이러스 진화 규명

- 전장 염기서열 분석 및 계통 수 분석을 통한 바이러스 진화 규명



[국내 야생철새에서 조류인플루엔자의 진화 분석]

□ 분리주 위험도 평가

○ 야생조류 종별, 지역별 위해요소 분석

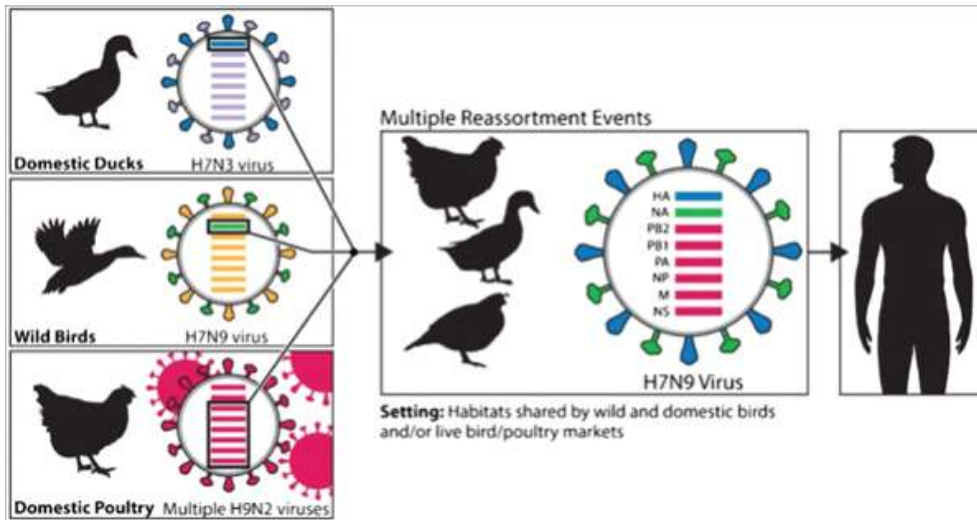
- 확인된 동물 유래 인플루엔자 바이러스 유전자 간 및 국내외 분리주와의 염기서열 비교 분석을 위한 MEGA 10.0 program (Software Development, Tokyo, Japan)을 사용하여 ClusterW program으로 염기서열 정렬

○ 전파위험도 평가

- 근접한시기에 인접지역에서 분리된 병원체간의 분자역학 관계를 구명함으로써, 한-일 양 국가 간 전파위험성 분석
- 주요 전파 바이러스 타입, 매개 야생철새종, 전파 시간차 등을 분석

○ 유전체 돌연변이의 위해요소 분석(유전체 재편성 및 재조합)

■ AIV의 재편성 분석

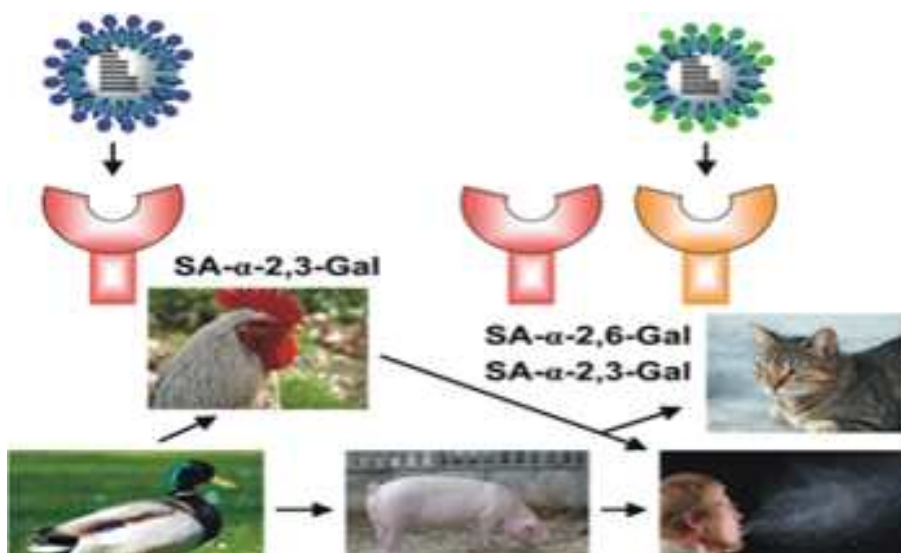


[조류인플루엔자 바이러스의 재배열 및 인간 감염 영향]

○ 핵심 아미노산의 분석(병원성, 숙주 특이성 등)

■ 조류인플루엔자

- 조류인플루엔자의 Q226L 변이는 hydrophobic의 특성으로 인해 조류 유래 인플루엔자 바이러스가 인간 인플루엔자 바이러스에 결합하는 α -2,6-linked sialic acid receptor에 대한 결합능력 증가



<조류 유래 RBS의 변이로 인한 인체감염 모식도>

- 오리 및 야생조류가 보유한 인플루엔자 바이러스를 분석하여 고병원성 여부 확인



<HA부위의 아미노산 분석(High pathogenic influenza virus)>

- NA부위의 아미노산을 변이(R294K)를 분석하여 항바이러스제의 내성을 가지는 분리주 분석
- PB2부위의 아미노산 변이(L89V, E627K)를 분석을 통해 포유동물 숙주에서의 바이러스 중합효소 활성, 조류인플루엔자 바이러스의 병원성, 복제능을 증가시키는 분리주 분석
- PB1부위의 아미노산 변이(H99Y, I368V)를 분석을 통해 포유동물 숙주에서의 바이러스의 전파가능성 있는 분리주 분석

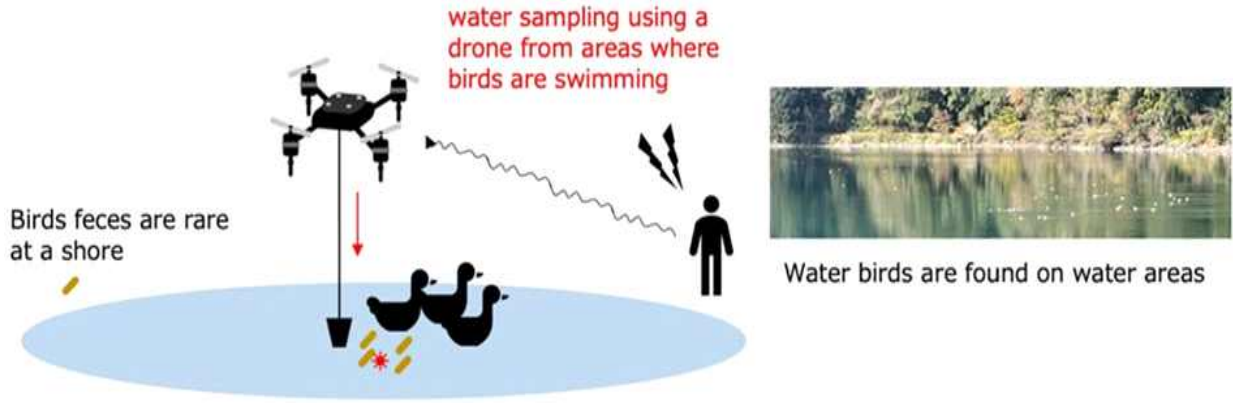
| Gene | Function | Sites | Position | Isolate |
|--------|--|---------------------------------------|-------------------|-----------|
| HA | Cleavage site | | | PEIPKGR*G |
| | RBS positions altered receptor specificity | Q226L | 226 | L |
| NA | Stalk | | 69-73 deletion | |
| | Antiviral resistance (oseltamivir) | Antiviral resistance (oseltamivir) | 294 | K |
| PB2 | Enhanced polymerase activity and increased virulence in mice | L89V | 89 | V |
| | | E627K | 627 | K |
| PB1 | H5 virus transmissible among ferrets | H99Y | 99 | Y |
| | | I368V | 368 | V |
| PB1-F2 | | Full length | 90 aa | |
| M1 | Increased virulence in mice | N30D | 30 | D |
| | | T215A | 215 | A |
| M2 | Antiviral resistance (amantadine) | S31N | 31 | N |
| NS1 | Increased virulence in mice | P42S | 42 | S |

□ 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발

○ 고품질 샘플 확보 체계 확립

■ 드론을 이용한 환경수 샘플링법 확립

- 철새 도래 초기단계의 경우 주로 수중에서 분변이 관찰되는 점에 착안하여, 철새들의 밀집 수중지역에서 직접 샘플링 할 수 있는 기술 확립



[Water sampling using a drone]

■ (휴대용) 모바일 qPCR을 이용한 고품질 샘플 선별

- 동물의 종을 식별하는데 주로 사용되는 미토콘드리아 시토크롬 C (CO1) 유전자를 다량 함유한 샘플의 경우 바이러스를 포함할 가능성이 높다는 점에 착안하여, CO1을 다량 함유한 고품질 샘플을 확보
- 휴대용 모바일 qPCR (PicoGene)을 이용하여 현장에서 고품질 샘플을 선별함
- 이를 위해 휴대용 핵산추출법 및 특이 Primers/Probe 세트 개발 필요

○ 환경수중의 바이러스 농축기술 확립

- 닭적혈구 응집반응법, 필터흡착법, 침전법 (PEG, BaSO₄), 자기비즈법 등을 비교평가
- 바이러스를 안정적으로 고농축시킬 수 있는 농축기술 최적화

○ 고효율 멀티진단 AI Rapid kit 개발

- 조류인플루엔자 바이러스의 H5, H7, H9 아형에 대한 모노클론항체 제작
 - H5/H7/H9 혈청형 HA 단백질에 대한 mAb를 생산하는 하이브리도마 세포의 생산 및 스크리닝
 - DNA 면역법 (HA 단백질에 대한 각 발현 플라스미드 벡터를 구축 후 마우스에 반복 주입)으로 항원에 면역하여 고효율 모노클론항체 생산
- H5/H7/H9 서브타입 면역크로마토그래피 현장진단키트 개발
 - H5/H7/H9 단백질에 대한 mAb를 이용해 기존에 개발된 바이러스용 Rapid kit strip을 구성
 - HA 아형별 단일 또는 멀티 아형 동시진단키트 시제품 제작

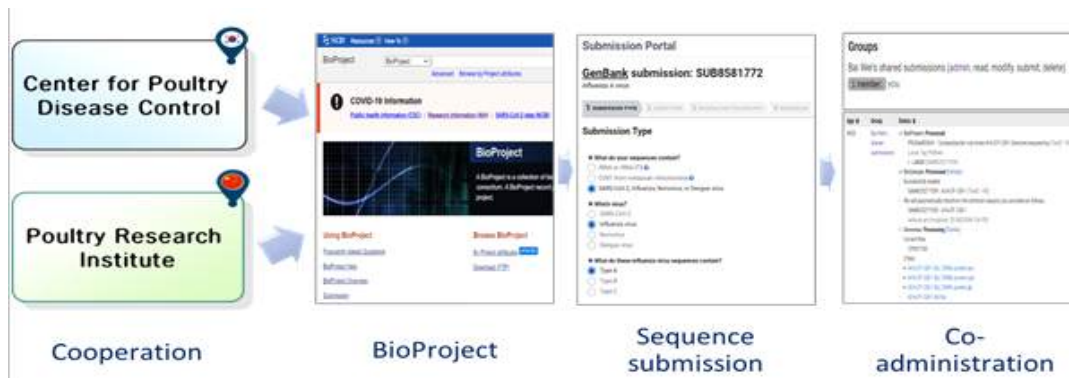
조기검출시스템 현장실증 및 야생철새 전파 바이러스질병
공동감시시스템 구축(한-일 중심의 동아시아권)

□ GenBank(유전자데이터 DB) 구축

○ GenBank 유전자원 데이터베이스(NCBI, BioProject) 구축

■ 유전자 데이터베이스 공유

- 확보된 동물 유래 바이러스 유전자 정보를 NIBI의 Bio Project 등록
- 별도의 데이터관리 및 시스템 없이 기존 시스템을 활용함으로 데이터의 안정적 공공화
- 동일시기, 제한된 지역에서 분리된 병원체의 유전자 정보를 상호가 공유함으로 향후 역학연구 등으로 지속적인 활용



<Establishment genetic database>

□ 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 현장실증

○ 실험실내 유효성검증

- Spiking test
- 야외시료 대상 스크리닝 테스트

○ 신규 조기진단기술 현장실증

- 대상 질병 : 조류인플루엔자(AI), 파라믹소바이러스(APMV)
- 대상 동물 : 야생조류, 가금농장
- 평가방법 : 기존 모니터링 시스템 대비 조기검출시스템의 신속정확성 평가

□ 국제협력 시스템 구축

○ AI, APMV 연구 및 진단기술 분석을 위한 정기적인 국제협력세미나 실시

| 구분 | 개최예정일 | 활동내용 |
|----------------------|-----------------------------|---|
| 정기협의회 (ZOOM 등 활용) | 연 2회 (과제 개시 후 6, 12개월 후) | - 실무자 중심 연구 추진 현황 및 결과 협의 |
| 국제공동세미나 | 1회, 23년 7월(예정) | - AI 발생현황 및 최신 진단기술 연구동향 주제로 각국의 전문가 초청 세미나 |

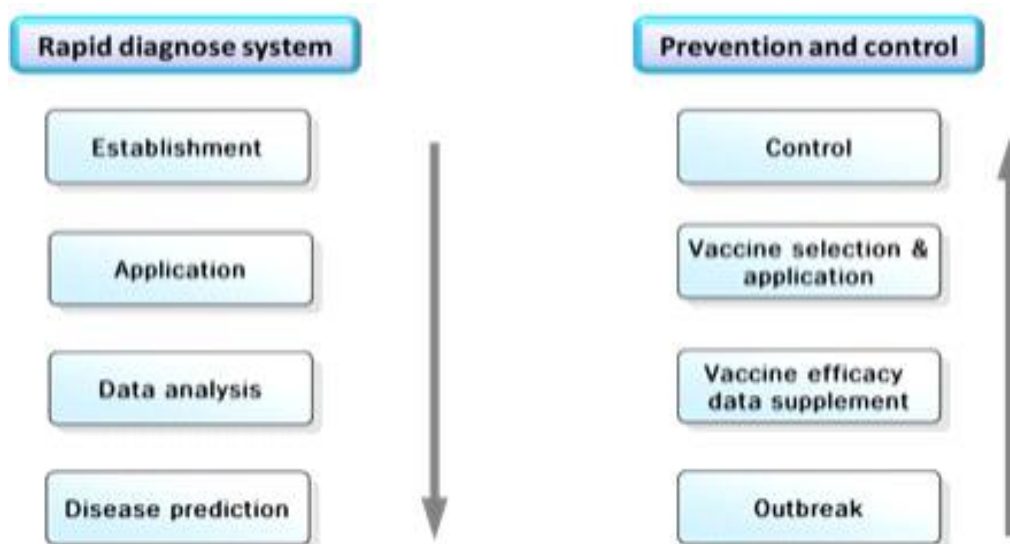
- AI, APMV 연구 및 진단기술 분야 전문성 강화를 위한 국제학술대회 및 연구논문 공동발표 (연 1회 이상)
- 개발기술 특허 공동 출원
- 공동연구 및 현장조사 등 교수 및 연구원 방문연구

| 대상 | 방문연구기간 | 예정일정 | 수행내용 | 예상인원 |
|-----|---------|-----------------------|--|------|
| 연구원 | 2주/연 1회 | 기간, 인원 등 포함하여 향후 상호협의 | 1. 현장조사(샘플링) 2. 휴대용 모바일 qPCR 을 이용한 고품질 샘플 채취법 등 교육 3. 바이러스 농축기술 등 교육 | 2명/연 |
| 교수 | 1주/연 1회 | | 1. 공동연구 내용 및 결과 등 협의 2. 유관기관 방문 및 자료조사 등 | 3명/연 |

- 한-일 양국간 교환학생 제도 활용 및 공동 교육프로그램 개발
 - 각 대학별 교환학생제도를 활용한 양 기관 간 학생 1명 이상 교류
 - AI, APMV 등 진단기술 내용 중심의 공동 교육프로그램 개발

□ 방역시스템 개선 정책제안

- 조기진단시스템을 활용한 방역시스템 개선방안 정책제안
 - 질병발생시 현장에서 조기에 진단 가능한 기술력 확보
 - 질병 발생 위험지역 및 야생철새 도래지 등 현장에서 진단 결과를 확보하여 질병 확산 방지
 - 유효 항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통해 진단기술의 핵심요소 확보
 - 신종 감염성 질병의 유행 가능성 및 분포 지역의 확대 등의 위험성이 매년 증가함에 따라 각 국가별 관리체계 확립과 질병 조기 진단을 위한 모니터링 기술 활용
- AI예찰 및 방역프로그램 정책제안
 - AI 예찰 및 방역프로그램 교류를 통한 국내 적용 가능한 기술 제안



<Prediction & providing prevention solution>

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

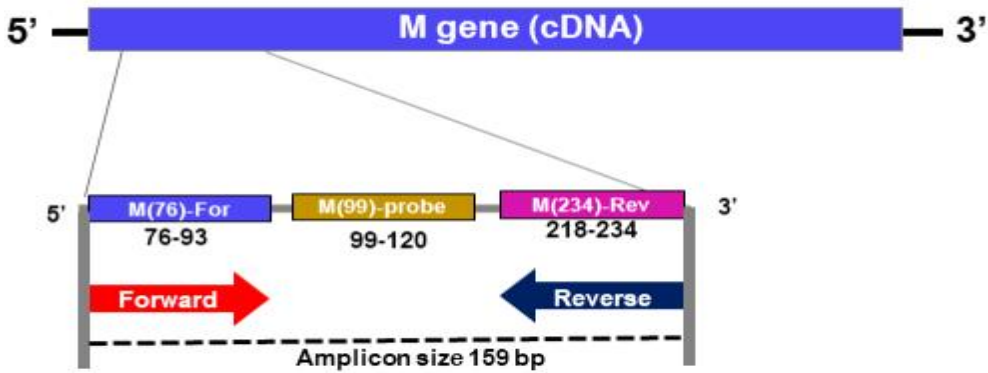
1차년도

야생철새 전파 바이러스질병 모니터링 및 조기검출시스템 개발

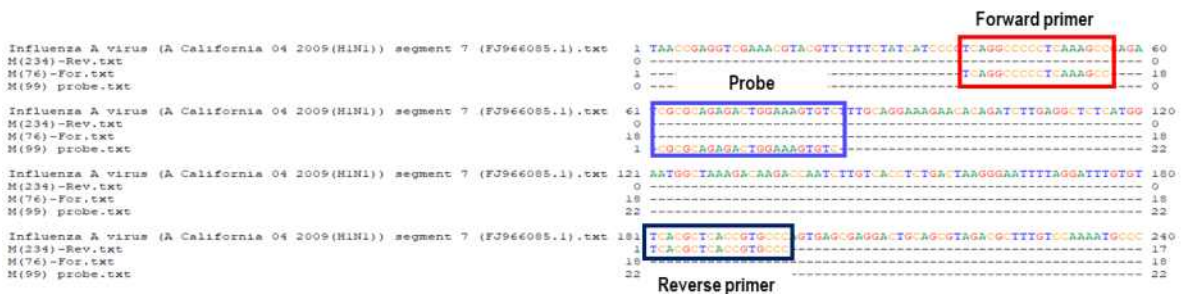
□ 한-일 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 모니터링

- 국내의 야생조류 및 가금농장 질병 모니터링
 - 조류인플루엔자 real time PCR 진단법 개발 및 모니터링
 - 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정
 - Matrix protein 타겟으로 작성

Influenza A virus (A/California/04/2009(H1N1)) Segment 7 (FJ966085.1)



[Primer 모식도]



[Primer alignment]

- 프라이머 작성 및 조건 설정

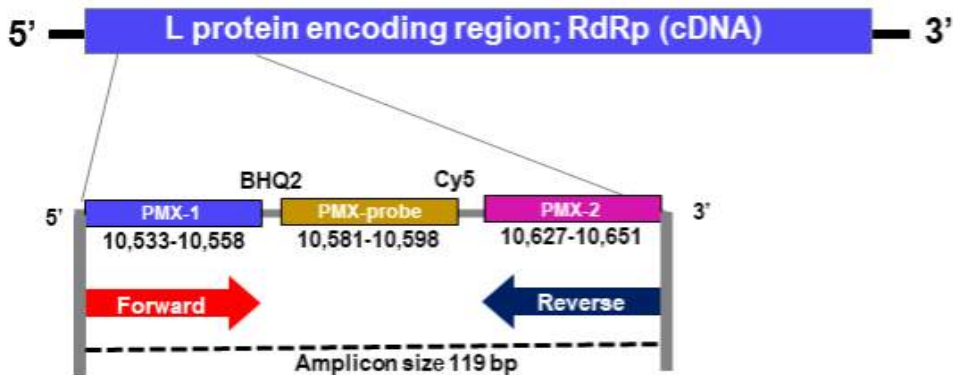
| Primer | Nucleotide (5' -3') | Target gene | Size | 표준주 |
|-------------|---|-------------|-------|--|
| M(76)-For | TCAGGCCCCCTCAAAGCC | M gene | 159bp | A/California/04/2009 (H1N1) (FJ966085.1) |
| M(234)-Rev | GGGCACGGTGAGCGTGA | | | |
| M(99)-Probe | FAM ^a -CGCGCAGAGACTGG AAAGTGTC-TAMRA ^b | | | |

| PCR Condition | | Temp.(°C) | Time |
|----------------------|--------------|-----------|-------|
| Initial Denaturation | | 95 | 5min |
| 40 cycles | Denaturation | 95 | 15sec |
| | Annealing | 54 | 1min |
| | Extension | 72 | 15sec |
| Final extension | | 72 | 10min |

| Component | Vol. | Conc. |
|--------------------|-------------|----------|
| 10XPCR Buffer | 2.5ul | |
| dNTPs Mix | 1.5ul | 2mM |
| Primer (F) | 1ul | 50pmol |
| Primer (R) | 1ul | 50pmol |
| DNA Template | 2ul | 100ng/ul |
| nTaq | 0.5ul | 5U/ul |
| ddH ₂ O | 16.5ul | |
| Total | 25ul | |

- 파라믹소바이러스 진단법 개발 및 모니터링
 - 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정
 - L protein 타겟 작성

Newcastle disease virus cDNA to complete genomic RNA, clone 30 (Y18898.1)



[Primer 모식도]

```

NDV (clone 30 strain) L protein (RdRp).txt 2101 TCAAGAGTCCCTAATGATGACATATATATTGTCAAGTCCAGAGGGGGTAT GAAGGATTA 2160
PMX-1.txt 1 ----- SAAGGCTCC 9
PMX-2 reverse.txt 0 ----- Probe --- 0
PMX-probe.txt 0 ----- --- 0

NDV (clone 30 strain) L protein (RdRp).txt 2161 TGCCAGAAGCTATGGACATGATCTCAATTGCTGCAA CCAACTTGCTGCAGCTAGATTGG 2220
PMX-1.txt 10 TGTCAAAAAGTGTGGAC----- 26
PMX-2 reverse.txt 0 ----- --- 0
PMX-probe.txt 1 ----- CCAACTTGCTGCAGCAGC----- 18

NDV (clone 30 strain) L protein (RdRp).txt 2221 CATTGTCGTGTTGCCGTATGGTACGGGTGATAATCAAGTAATAGCAGTACGGAGAGAG 2280
PMX-1.txt 26 ----- --- 26
PMX-2 reverse.txt 1 ----- G-GCGATAATCAACTCATAGCCACA----- 24
PMX-probe.txt 18 ----- --- 18

```

[Primer alignment]

| Virus | Primer | Sequence(5'-3') | Target gene | Size |
|---------------|--------|----------------------------|-------------|------|
| Paramyxovirus | PMX 1 | GARGGIYIITGYCARAARNTNTGGAC | L protein | 121 |
| | PMX 2 | | | |

| PCR Condition | | Temp. (°C) | Time |
|----------------------|--------------|------------|-------|
| Initial Denaturation | | 94 | 10min |
| 45 cycles | Denaturation | 94 | 15sec |
| | Annealing | 45 | 30sec |
| | Extension | 72 | 30sec |
| Final extension | | 72 | 10min |

| Component | Vol. | Conc. |
|--------------------|-------------|----------|
| 10XPCR Buffer | 5ul | |
| dNTPs Mix | 3ul | 2mM |
| Primer (F) | 1ul | 50pmol |
| Primer (R) | 1ul | 50pmol |
| DNA Template | 10ul | 100ng/ul |
| eTaq | 1ul | 5U/ul |
| ddH ₂ O | 29ul | |
| Total | 50ul | |

○ 일본 야생조류에 대한 질병 모니터링

■ 지역 : 미야자키현(일본 내 지속적인 고병원성 조류인플루엔자 발생 보고 지역)

- 철새도래지(니츠타치 조정지, 미이케)에서 환경수와 및 야생조류 분변채취 및 조사를 실시함



■ 검출결과 1 : 11월 7일 채취

- 채취한 야생조류 분변 90개 검체를 계란에 접종 후, 조류인플루엔자 바이러스(AI) 및 파라믹소바이러스(APMV)를 분리함
- 9-11일령 각 2개 발육란에 야생조류 분변(약 10% 분변유제 상청)을 100-200ul 접종하고, 2-3일간 배양 후 장노액 회수 후 HA 테스트로 AI, APMV 분리 성공여부 확인함
- HA test 양성 검체는 인플루엔자 신속진단키트와 유사하게 파라믹소바이러스를 검출하는 RT-PCR법을 이용해 분리 바이러스 판별하고, 차세대 시퀀스로 바이러스 게놈 전체 길이를 결정함
- 11월 7일의 조사에서 HA test 결과 양성검체는 4개(4.4%)였으나, 조류인플루엔자 신속진단키트에서 모두 음성으로 판별됨
- 해당 검체들은 향후 PCR로 파라믹소바이러스를 검출해 차세대 시퀀스에 의한 바이러스 종류를 동정할 예정임

■ 검출결과 2 : 11월 21일 채취

- 야생조류 분변 69개 검체, 환경수 3개 검체 채취하였고, AI 및 APMV 분리 예정임

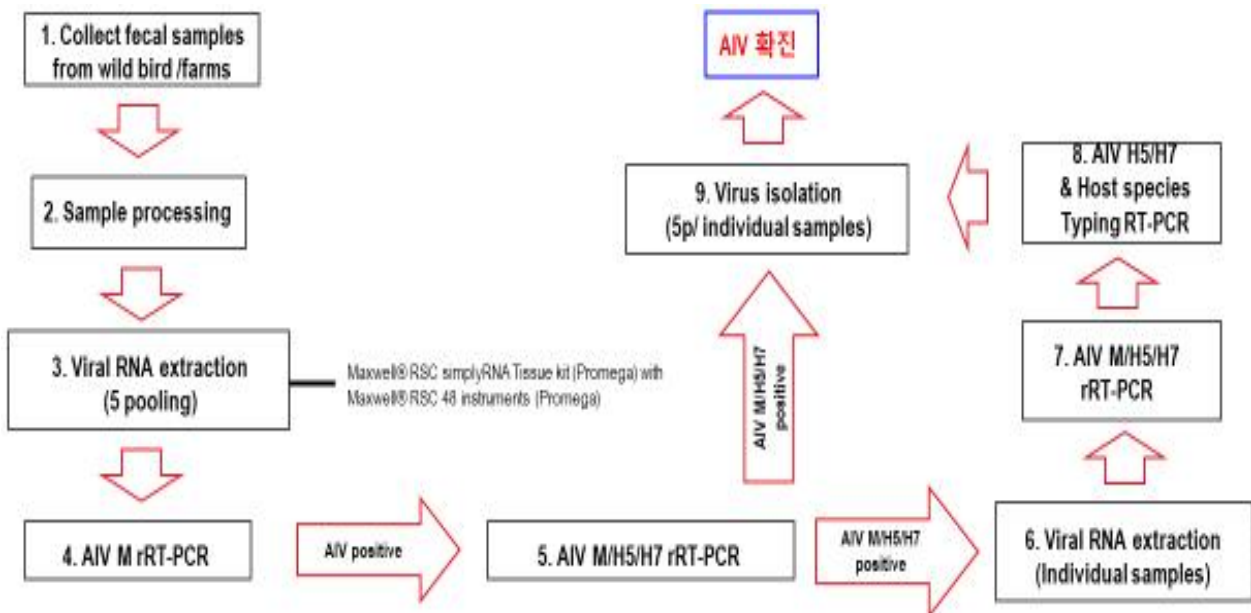
[미야자키현에서 채취한 야생조류 분변 및 환경수 : AI 및 APMV 검출결과]

| 채취시기 | 채취장소 | 대상 및 시험결과 | | | |
|------------|----------|-----------|-----|------------|-----------------|
| | | 분변 | 환경수 | HA test 양성 | Flu A 신속진단키트 양성 |
| 2022.11.07 | 니츠타치 조정지 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 미이케 | 60 | 0 | 4(분변유래) | 0 |
| | 소계 | 90 | 0 | 4(분변유래) | 0 |
| 2022.11.21 | 니츠타치 조정지 | 49 | 3 | ND | ND |
| | 미이케 | 17 | 0 | ND | ND |
| | 소계 | 69 | 3 | | |
| 합계 | | 159 | 3 | 4(분변유래) | 0 |

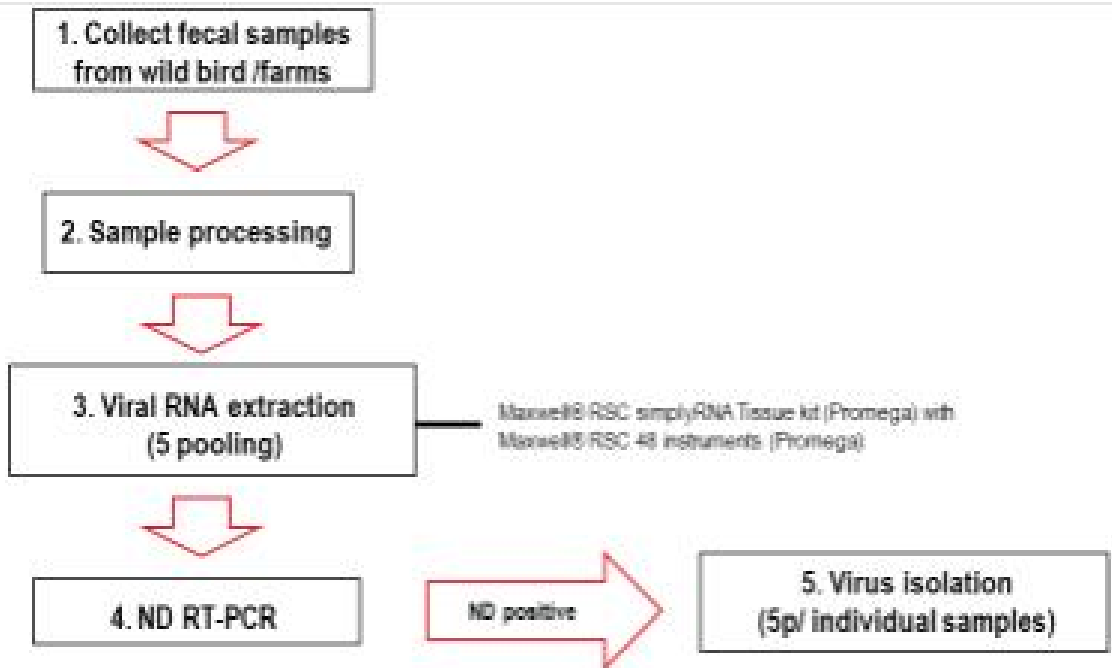
- 지속적인 모니터링으로 야생조류로부터의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 조기 검출이 기대되며, 검출 결과를 바탕으로 양계농장의 AI 방역 경계 수준의 고도화가 가능함
- 또한, 파라믹소바이러스 전파 대비 방역대책을 구축하고, 한·일 양국 AI, APMV 유행 현황을 비교하여 향후 질병 역학조사 확립 등이 기대됨

○ 모니터링 기술 체계화

- 조류인플루엔자 및 파라믹소바이러스 모니터링법 체계화



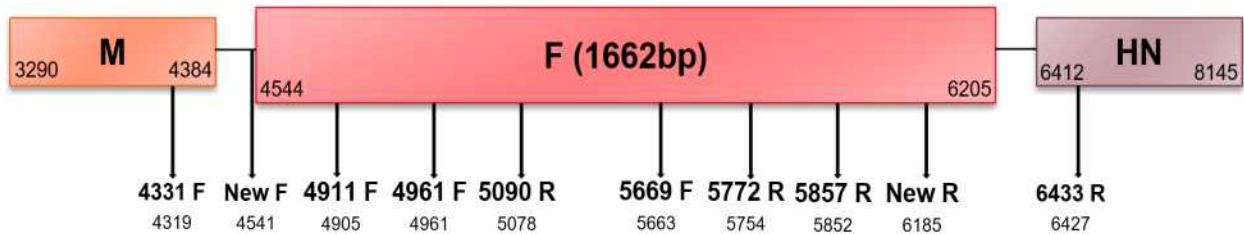
[조류인플루엔자 모니터링법 확립]



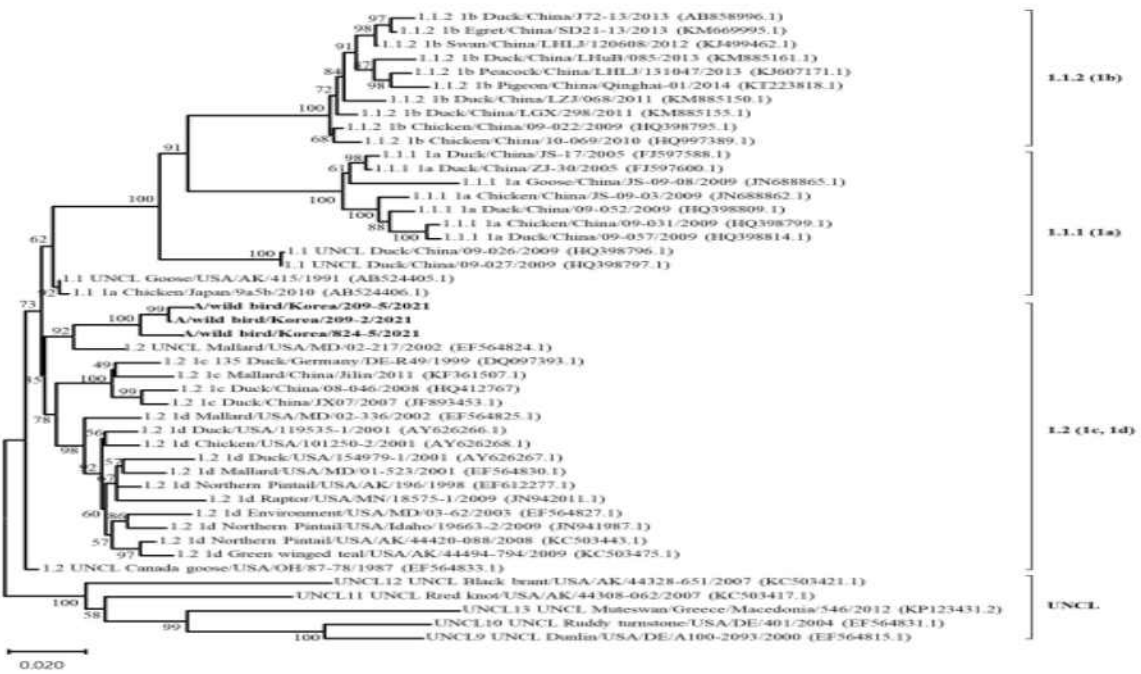
[파라믹소바이러스 모니터링법 확립]

□ 유전체 전장 분석을 통한 특성연구(분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명)

○ 파라믹소 바이러스 유전체 전장 및 분자역학 분석

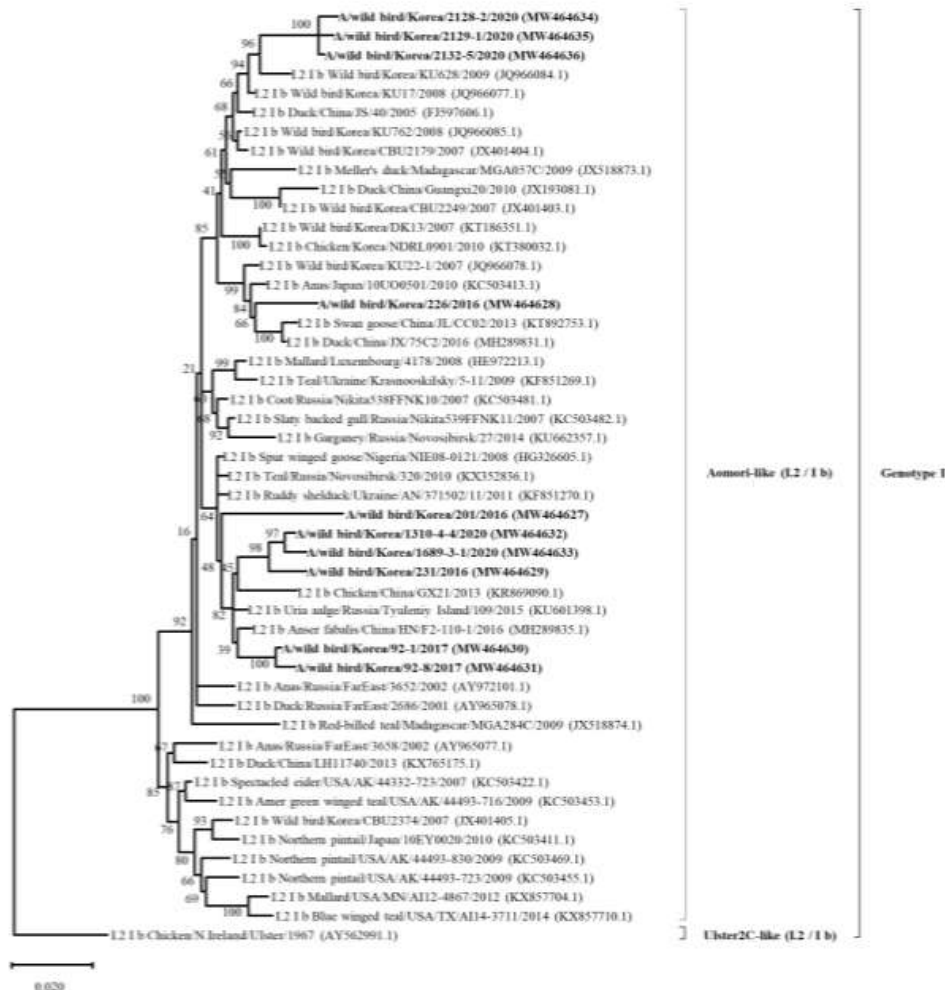


| No. | Primer | Location | Sequence(5'-3') | TM in °C |
|-----|--------|-----------|-------------------------------|-----------|
| 1 | 4331 F | 4319-4343 | GAGGTTACCTCYACYAAGCTRGAGA | 56-61 |
| 2 | New F | 4541-4560 | AGATGGGCTCCAGATCTTCT | 48~56 |
| 3 | 4911 F | 4905-4922 | TTATTGGCGGTGTGGCTC | 50.3 |
| 4 | 4961 F | 4961-4982 | GCTCTGATACARGCMAAMCAAA | 49.2-54.8 |
| 5 | 5669 F | 5663-5682 | AGTTACATCGAATTCCCCACTG | 53.8 |
| 6 | 5090 R | 5078-5106 | TCATTAACAAAYTGCTGCATCTTCCCWAC | 57.3-58.7 |
| 7 | 5772 R | 5754-5772 | TGCGATATGATWCCCGGRG | 51.1-53.2 |
| 8 | 5857 R | 5852-5873 | AGTTACATCGAATTCCCCACTG | 53 |
| 9 | New R | 6185-6204 | CACATTTTYGTAGTGGCYCTC | 45~55 |
| 10 | 6433 R | 6427-6445 | TCTCTAACGCAACTTGGCT | 48.9 |



[파라믹소바이러스 계통수 분석(1)]

- 파라믹소바이러스 유전체 전장 분석을 통한 APMV-1 class I으로 계통수 분석 수행



[파라믹소바이러스 계통수 분석(2)]

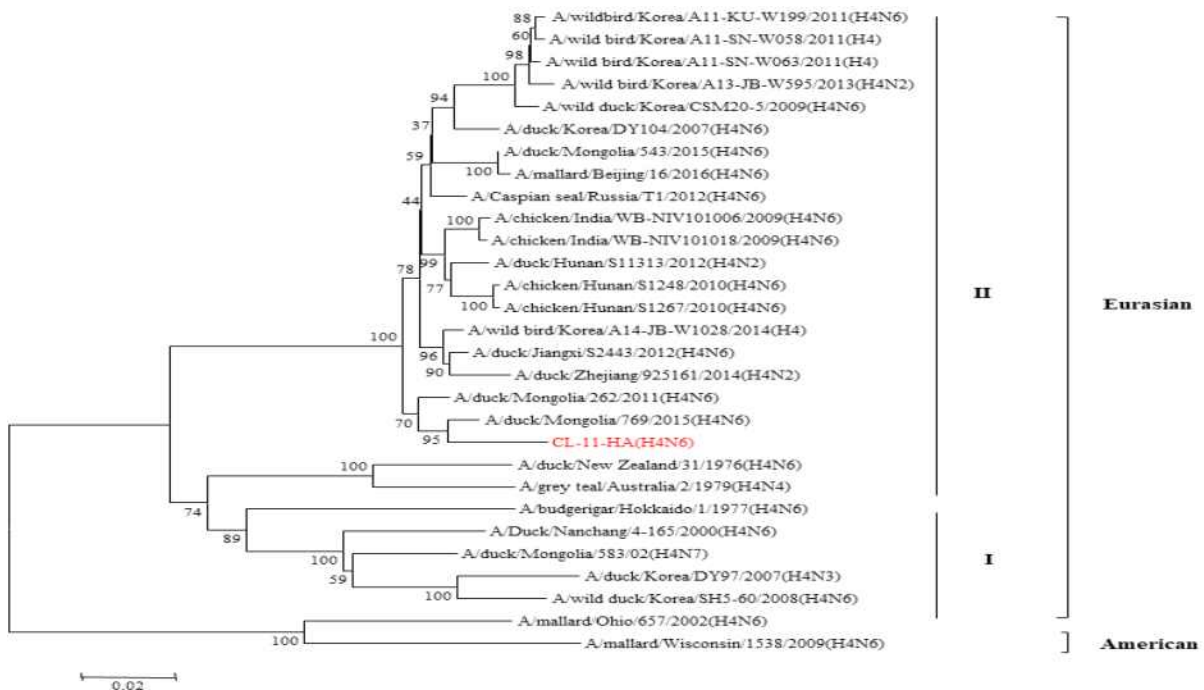
- 파라믹소바이러스 유전체 전장 분석을 통한 APMV-1 class II으로 계통수 분석 수행

○ 인플루엔자바이러스 유전체 전장 분석 및 분자역학 분석

■ 인플루엔자바이러스 유전체 전장 분석

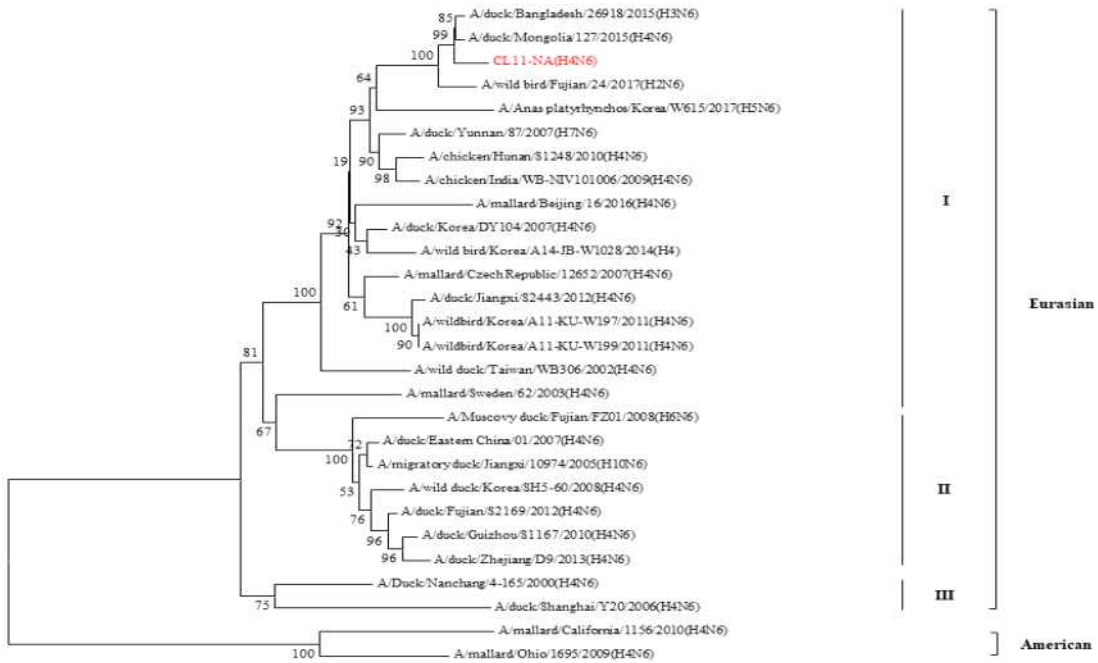
| Gene (full size) | Primer (5'-3') | | Size (bp) |
|------------------|------------------|---|-----------|
| PB2 (2341bp) | Ba-PB2-1 | TAT/TGG/TCT/CAG/GGA/GCG/AAA/GCA/GGT/C | 1250 |
| | PB2-1250R | TCYTCYGTGARAAAYACCAT | |
| | PB2-1105F | TAYGARGARTTCACAATGGT | 1236 |
| | Ba-PB2-2341 | ATA/TGG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAG/GTC/GTT/T | |
| PB1 (2341bp) | Bm-PB1-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCG/AAA/GCA/GGA/C | 1262 |
| | PB1-1262R | TTRAACATGCCCATCATCAT | |
| | PB1-1124F | ARATACCNGCAGARATGCT | 1217 |
| | Bm-PB1-2341R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAG/GCA/TTT | |
| PA (2233bp) | Bm-PA-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCR/AAA/GCA/GGT/AC | 1498 |
| | PA-1498R | TNGTYCTRCAYYTGCTTATCAT | |
| | PA-747F | CATTGAGGGCAAGCTTTC | 1498 |
| | Bm-PA-2233R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAG/GTA/CTT | |
| HA (1778bp) | Bm-HA-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCA/AAA/GCA/GGG/G | 1310 |
| | Pan-IVA-S4-1451R | ACCAGAAGTTCAGCATTTRTAWGWCC | |
| | Pan-IVA-S4-1198F | GGA ATG RTA GAT GGT TGG TAY GG | 710 |
| | Bm-HA-1778R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAGG/GTG/TTT/T | |
| NP (1565bp) | Bm-NP-1 | TATTCGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGGTA | 1490 |
| | Pan-IVA-S5-1471R | CCA TCG GGY TCG BTG CCT T | |
| | Pan-IVA-S5-1448R | GGG AGT CTT CGA GCT CTC | 155 |
| | Bm-NP-1565R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAG/GGT/ATT/TTT | |
| NA (1413bp) | Ba-NA-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCA/AAA/GCA/GGA/GT | 1050 |
| | Pan-IVA-S6-1158R | TNT TGC TTW TNG TTC TTC CYA WCC A | |
| | Pan-IVA-S6-906F | TCA NAT GTG TNT GCA GRG AYA A | 550 |
| | Ba-NA-1413R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/AGT/AGA/AAC/AAG/GAG/TTT/TTT | |
| M (1027bp) | Bm-M-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCA/AAA/GCA/GGT/AG | 1027 |
| | Bm-M-1027R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATTAGT/AGA/AAC/AAG/GTA/GTT/TTT | |
| NS (890bp) | Bm-NS-1 | TAT/TCG/TCT/CAG/GGA/GCA/AAA/GCA/GGG/TG | 890 |
| | Bm-NS-890R | ATA/TCG/TCT/CGT/ATT/ AGT/AGA/AAC/AAG/GGT/GTT/TT | |

■ 인플루엔자바이러스 분자역학 분석



[H4N6의 HA 유전체 분석]

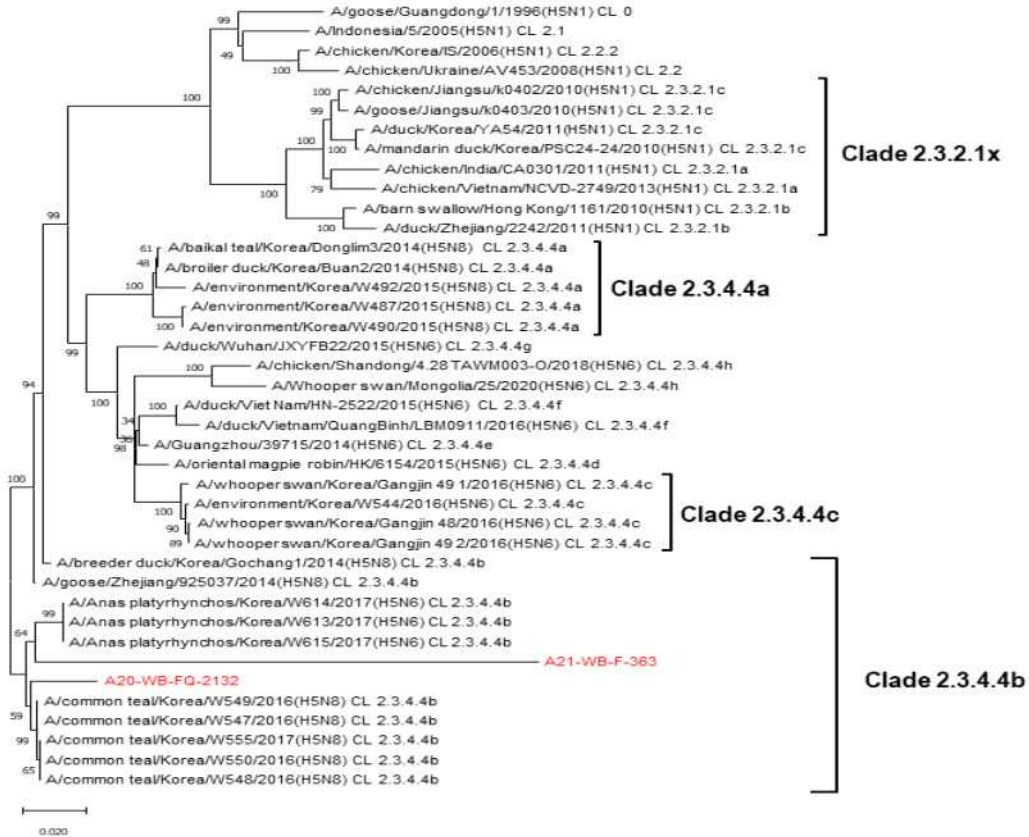
■ H4N6의 HA 유전자가 Eurasian Type II 내 속함을 확인



[H4N6의 HA 유전체 분석]

■ H4N6의 NA 유전자가 Eurasian Type I 내 속함을 확인

H4N6 HA, NA 유전자가 Eurasian Type I, II의 recombination됨을 확인



[H5의 HA 유전체 분석]

■ H5 HA 유전체를 분석하였을 때 clade 2.3.4.4b 확인

- 현재 프랑스, 네덜란드, 미국, 일본 등 전 세계에 전파되어 있는 것으로 알려짐
- 여러종의 야생조류를 감염시키는 것으로 확인

□ 분리주 위험도 평가

○ 야생조류 종별, 지역별 위해요소 분석

■ APMV-13 야생철새 분리주 위험도 분석

- APMV-13형은 이전에 일본, 우크라이나, 카자흐스탄, 중국의 야생철새에서 분리되었지만, 국내에서는 처음으로 분리됨

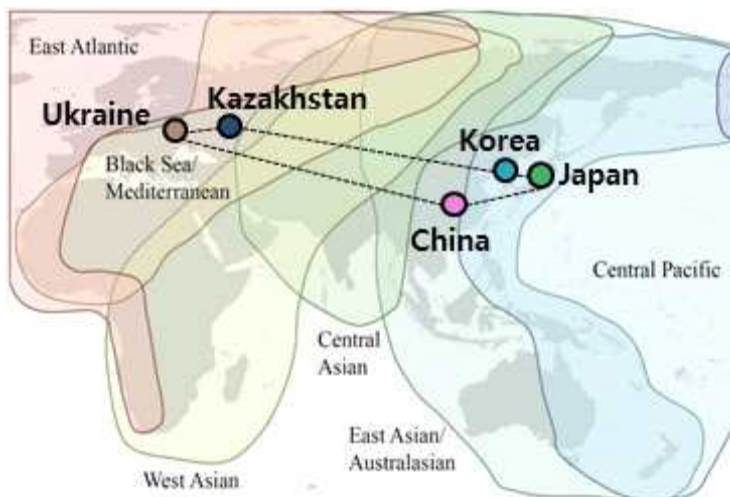


[APMV-13]

- 기러기에서 분리되었으며, 기존의 해외에서 분리된 야외주와 높은 상동성을 확인

| A Greater White-fronted Goose Korea 29-9 2017 | |
|--|---------------|
| Isolate (APMV-13) | Homology (%)* |
| Wild goose China Hubei V93-1 2015 | 97.7 / 96.5 |
| Goose Shimane 67 2000 | 95.9 / 95.7 |
| Goose Kazakhstan 5751 2013 | 96.8 / 96.5 |
| White-fronted goose Ukraine Askania-Nova 48-15-02 2011 | 95.7 / 95.9 |

○ 전파위험도 평가



큰기러기



쇠기러기

[기러기 이동경로 분석]

- 일본, 우크라이나, 카자흐스탄, 중국 등에서 분리된 기존의 APMV-13와 유사한 상동성을 보였으며, 기러기의 이동경로는 해당 국가들을 경유하기 때문에 기러기가 APMV를 전파하는 잠재적인 숙주로서 평가됨

- 대륙(북미) 간 전파 가능성, 야생철새에서 가끔으로의 전파와 병원성 증가 가능성 및 야생철새에서 APMV에 대한 지속적인 모니터링이 필요함

□ 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 개발

○ 고품질 샘플 확보체계 확립

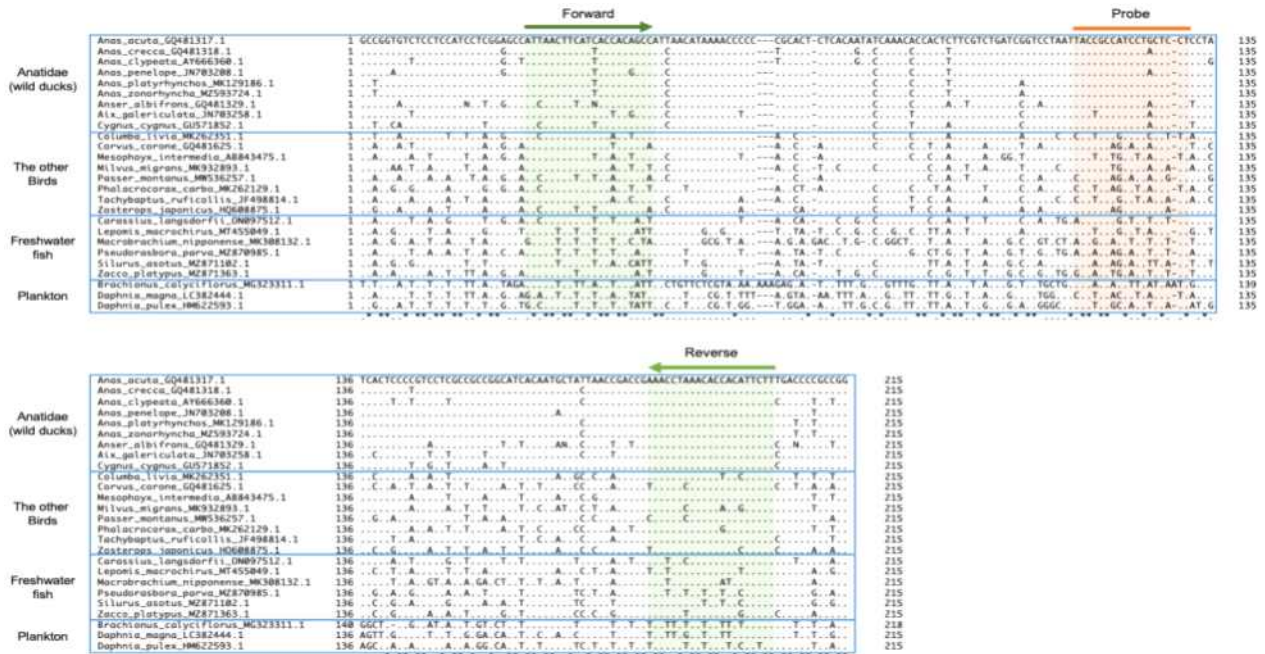
■ 드론을 이용한 환경수 샘플링법 확립

- 현재 충분한 환경수를 확보할 수 있는 드론 기종을 선택 중이며, 1회 비행으로 최소 1L의 물을 회수할 수 있는 기종을 후보로 함

■ (휴대용) 모바일 qPCR을 이용한 고품질 샘플 선별

- 조류(특히 수금류)의 미토콘드리아 티토크롬C(CO1) 유전자를 많이 함유한 샘플은 포함되지 않은 샘플에 비해 바이러스가 포함됐을 가능성이 높음
 - 조류(수금류) CO1 유전자를 많이 함유한 고품질 환경수를 현장에서 회수 시, 구분하는 것을 목적으로 함
- 환경수 중에서 조류(수금류) CO1 유전자 복제수를 현장에서 휴대용 모바일 qPCR 장치 (PicoGene)를 이용하여 정량이 필요함
 - 현장에서의 간이 핵산추출법 및 조류(수금류) CO1 유전자에 특이적인 Primers/Probe 세트 개발이 필요함
- CO1 유전자를 표적으로 한 Primers/Probe에 대해 Multiple sequence alignment (MSA) 해석으로부터 각각 아래 그림에 표시한 영역으로 함

[조류 및 수서생물의 CO1 유전자 MSA 와 Primers/Probe 표적 영역]



- 환경수 간이 핵산추출방법은 Lysis Buffer S (Takara Blo)에 의한 조추출을 검토중이며, 본 방법에서는 샘플과 Lysis Buffer S의 같은 양을 혼합하고, 실온에 5분간 정치하여 PCR 주형이 가능함

- 인플루엔자바이러스를 이용한 예비 시험에서 Ct값이 2~3 cycle 개선 확인함

■ 효율적인 병원체 검출을 위해 조류 CO1 유전자를 많이 포함한 고품질의 환경수가 필요함

- CO1 유전자를 표적으로 한 모바일 qPCR이 확립되면 환경수를 채취하고 있는 지역의 철새 유입량을 객관적으로 확인할 수 있음
- 특정 지역의 철새 유입량의 확인으로 SI 검출률 향상 기대

○ 환경수중 바이러스 농축기법 확립

- 바이러스의 검출 감도를 올리기 위해서는 전처리 기술로 바이러스 농축 필요
 - 닭 적혈구 응집반응법, 필터흡착법, 침전법 (PEG, BaSO₄), 자기비즈법, 한외여과법 등을 비교 평가하여 바이러스를 안정적으로 고농축 할 수 있는 최적화 기술 확립 예정
- PEG 침전법
 - 증류수에 인플루엔자 바이러스를 spike하고 여기에 PEG8000과 NaCl을 각각 농도 10%(w/v) 및 1M이 되도록 첨가하여 4℃에서 하루 반응
 - 이후 12,000×g, 30분, 4℃에서 원심분리하여 상청을 제거한 뒤 원래 양의 100분의 1의 양으로 resuspension하여 인플루엔자 바이러스 정량 RT-PCR 시행한 결과, 농축 효과는 확인되지 않았음
- 닭 적혈구 응집반응법에 의한 농축의 검토 및 최적화 실시
 - 900mL의 환경수에 10x 농도의 PBS를 100mL 첨가하고 닭 적혈구를 적당량 첨가
 - 4℃에서 일정 시간 반응하고 Disposable vacuum filter unit을 이용하여 흡인여과 실시
 - 필터상의 닭 적혈구를 소량의 PBS로 resuspension시켜 가온 보존 시험하여 인플루엔자 바이러스를 분리시키고 핵산 검출 등을 실시할 예정임
- PEG 침전법을 이용해 100배 농축에 성공했지만 RT-PCR에 의한 검출 감도에는 농축효과가 확인되지 않음. 향후 닭적혈구를 이용한 농축법을 확립하여 이를 이용한 AI의 유전자 검출뿐 아니라, 살아있는 바이러스의 분리 효율이 상승할 것으로 기대함

□ 고효율 멀티진단 AI Rapid kit 개발

○ 조류인플루엔자 바이러스의 H5/H7/H9 아형에 대한 모노클론항체 제작

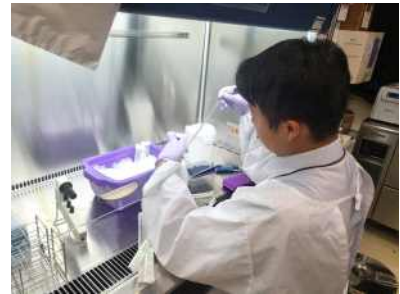
- H5/H7/H9 혈청형 HA 단백질에 대한 모노클론 항체를 생산하기 위해 펩타이드 면역법 이용
 - H5 아형에 대해서는 아미노산 잔기 107-127 및 158-170이 clade 간에 보존되고 변성 상태에서 검출 가능한 Epitope로 발견됨(Gronsang et al, Arch Virol, 2017; Takahashi et al, Biochem Biophys Res Commun, 2018)
 - 한국에서 발생한 H5/H7/H9의 clade 배열을 기반으로 한 펩타이드 합성을 외부 의뢰하고, 이들을 마우스에 면역하여 모노클론 항체를 얻을 계획임
- H5/H7/H9아형에 대한 모노클론 항체를 제작하기 위해 최적의 Epitope 영역을 탐색함
 - 아미노산 잔기 107-127 및 158-170 영역이 중요한 Epitope임을 밝힘
 - 이 영역 배열을 기반으로 한 펩타이드를 외부 합성 의뢰하고 마우스 면역을 실시하여 AI 항원을 인식하는 immunochromatography 신속진단키트 개발을 기대

□ 한-일 연구자 과제협의회

- 일본 CADIC 연구자 국내 방문 및 과제협의
 - Tamaki Okabayashi, Kentaro Yamada, Norimine Junzo
 - 2022년 10월 22일 ~ 26일
 - 문헌 및 현장조사, 공동연구 및 향후 방안 협의 등



- 한국 CAD 연구자(4인) 일본 CADIC 방문 및 과제협의
 - 장형관, 차세연, 강민, 강형섭
 - 2022년 11월 11일 ~ 17일
 - 1차년도 국제공동연구 현황 협의, 2차년도 연구원 교류 일정 협의 등



○ 공동 세미나 및 워크숍



| 구분 | 내용 |
|----------------|--|
| 세미나 워크숍 | - 한·일 공동 세미나 및 워크숍(22.10.23, 한국) - 온라인 정기 세미나(분기별 1회, ZOOM 활용, 프로젝트 수행현황 점검 등) |
| 국제 심포 지엄 | - 일본 CADIC 국제 심포지엄(22.11.16, 일본) - 주제 : 아시아 수의학 교육 및 연구네트워크 * 수의학 교육의 현황 및 과제 * 아시아 네트워크 현황 / 연구 및 기술교류 |

□ 국제협력 시스템 구축

- 국제공동연구 활성화를 위한 전북대 조류질병연구소 CADIC 간 MOU 협약 체결
 - 연구원 및 학생교류, 공동연구 수행 등 협력 교류 활성화('22.07.12.)

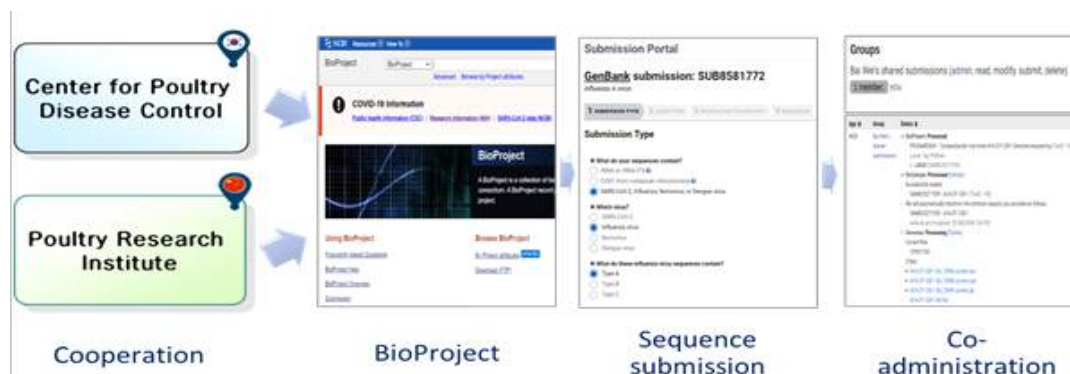


<한·일 연구기관 MOU 협약체결>

2차년도 **조기검출시스템 현장실증 및 야생철새 전파 바이러스질병 공동감시시스템 구축(한-일 중심의 동아시아권)**

□ GenBank(유전자데이터 DB) 구축

- GenBank 유전자원 데이터베이스(NCBI, BioProject) 구축
 - 유전자 데이터베이스 공유
 - 확보된 동물 유래 바이러스 유전자 정보를 NIBI의 Bio Project 등록
 - 별도의 데이터관리 및 시스템 없이 기존 시스템을 활용함으로 데이터의 안정적 공공화
 - 동일시기, 제한된 지역에서 분리된 병원체의 유전자 정보를 상호가 공유함으로 향후 역학연구 등으로 지속적인 활용



<Establishment genetic database>

□ 야생철새 전파 바이러스 조기검출시스템 현장실증

- 실험실내 유효성검증
 - Spiking test
 - 야외시료 대상 스크리닝 테스트

○ 유전자원 교류

- 일본 유래 APMV 1주 교류 예정,
- 상호 유전자 정보공유로 역학연구 등 활용

○ NCBI Bio Project 기탁

- 확보한 AIV 5주 기탁

| No. | SeqID | 생명자원명 | 등록/ 기탁번호 | 등록일 |
|-----|-------------|---------|-------------|------|
| 1 | A21-WB-F-54 | 조류인플루엔자 | 0Q132764 | 2022 |
| 2 | A21-WB-F-56 | 조류인플루엔자 | 0Q132765 | 2022 |
| 3 | FQ1593-4 | 조류인플루엔자 | 0R794291 | 2023 |
| 4 | FQ363-5 | 조류인플루엔자 | 0R794201 | 2023 |
| 5 | FQ2132-4 | 조류인플루엔자 | 0R794004 | 2023 |

<AIV 5주 NCBI 기탁 정보>

○ 신규 조기진단기술 현장실증

- 대상 질병 : 조류인플루엔자(AI), 파라믹소바이러스(APMV)
- 대상 동물 : 야생조류, 가금농장
- 평가방법 : 기존 모니터링 시스템 대비 조기검출시스템의 신속정확성 평가

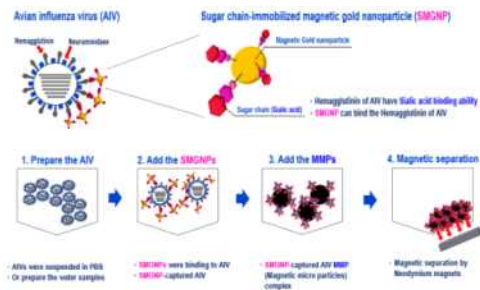
○ 드론을 이용한 환경수 샘플링법 확립 ▶ 1회 비행으로 최소 1L 환경수 회수

○ qPCR을 이용한 고품질 샘플 선별 ▶ 현장에서 바로 진단 및 양성시료 검출

○ 물시료 농축을 통한 진단 민감도 향상 ▶ 당사슬결합 나노입자 활용 및 토양성분 활용



<드론 및 모바일 qPCR을 활용한 조기검출 시스템 확립>



<환경수중 바이러스 농축기법 확립>

○ 드론을 이용한 환경수 샘플링

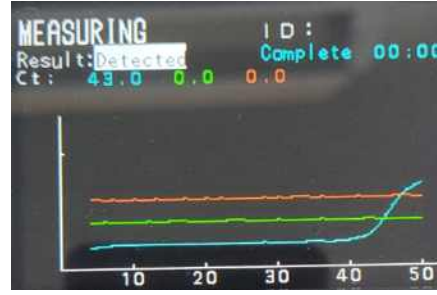
- 철새도래 초기단계 수중분변 관찰을 위한 환경수 채취 및 철새 밀집 수중지역
- 철새 밀집 수중지역, 직접 샘플링 가능



<드론 활용 환경수 채취 및 샘플 선별>

○ 모바일 qPCR 이용한 샘플링

- 조류 CO1 유전자 함유된 고품질 환경수 샘플 회수



<모바일 qPCR 활용, 국내 철새도래지 AIV 신속진단>

- Mobile qRT-PCR은 PicoGene PCR1100 (NSG, Japan, Cat.No: PCR1100E)기기를 사용하여 진행
 - PCR 진단 시 타겟하는 유전자는 AIV 내에서 보존적인 구역으로 알려져 있으며, PCR 등의 진단법에서 많이 사용되는 AIV-Matrix (M) gene을 타겟으로 하는 Primer 및 probe를 사용
 - 기기에서 peak가 보이고 Detected 문구와 함께 Ct 값이 나타나면 양성, 그래프의 변화가 거의 없거나 weak peak를 보이며 Not detected 문구가 나타나면 음성으로 판정

Table 1. Primer sequences for the qRT-PCR using the PicoGene PCR1100 device

| Designation | Sequence (5'-3') |
|-----------------|--------------------------------|
| WHO-IAV-M-F | CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA |
| WHO-IAV-M-R | GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA |
| WHO-IAV-M-Probe | FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG-BHQ1 |

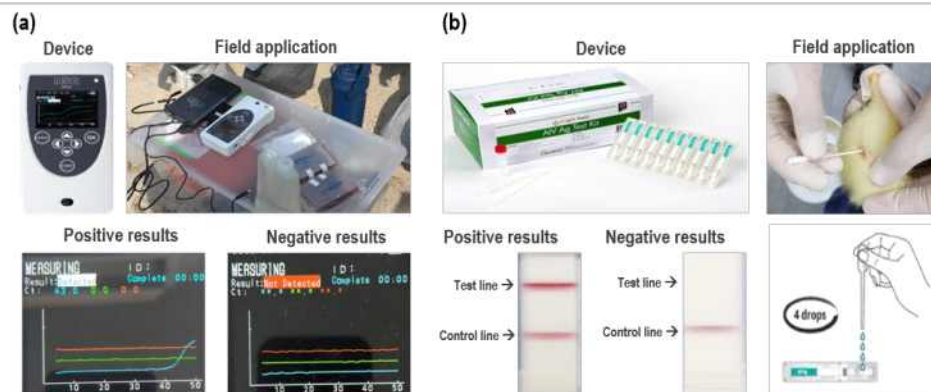


Figure 1. Used point of care test (POCT) devices in this study. 1a indicated that mobile qRT-PCR using the PicoGene PCR1100 device. The diagnostic results were indicated in quantitative Ct value. 1b indicated that rapid antigen test device using the AIV Ag test kit. The diagnostic results were indicated in qualitative results via naked eyes. Both of the POCT devices can also be applied in field conditions.

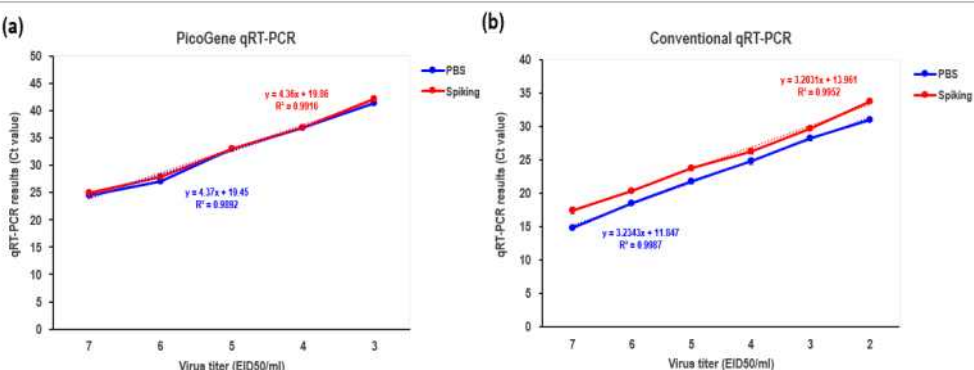
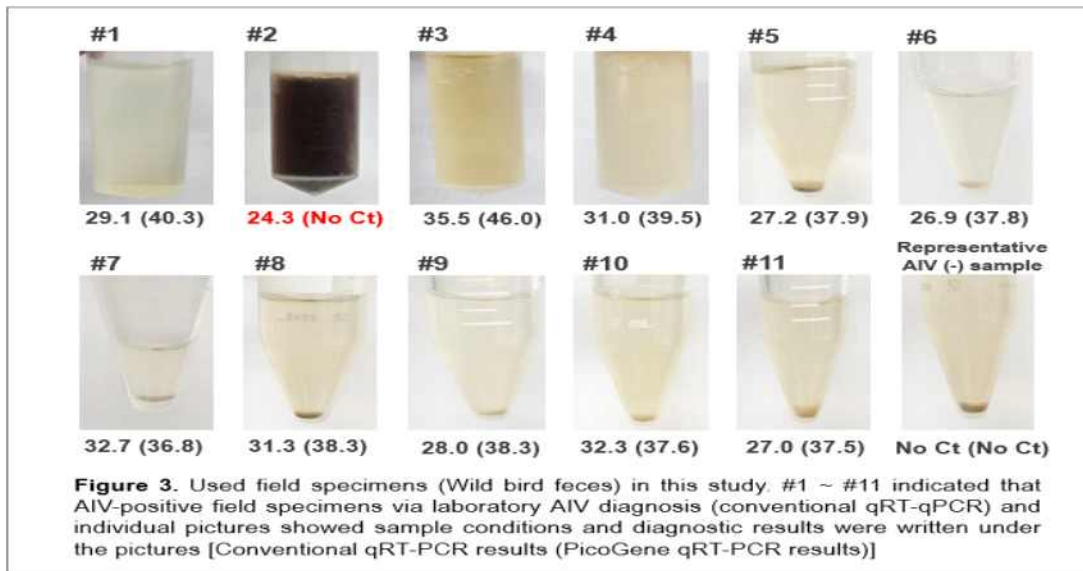


Figure 2. Comparison of the qRT-PCR using the PicoGene PCR1100 device (2a) and the conventional qRT-PCR using the VDX AIV M qRT-PCR Ver2.1 (2b). The qRT-PCR assays were performed using 10-fold serial dilutions of the LPAI H9N2 virus in PBS or spiked with AIV-negative wild bird feces. The red colored line show the results from tested in PBS, and the blue colored line show the results from tested in spiking specimens. For each analysis, Pearson correlation coefficient (R^2) are also indicated.

- Picogene qRT-PCR에서 sensitivity test와 spiking test의 Ct value를 비교했을 때 일치한 양상을 보여 통계적으로 유의적인 차이가 없음
- 실제 현장에서 사용하고 있는 AIV Ag test kit는 사용이 편해 누구나 쉽고 빠르게 현장에서 POCT가 가능



○ 환경수중 바이러스 농축기법 확립

- 당사슬결합 나노입자 활용 및 토양성분 활용



<모바일 qPCR 활용, 국내 철새도래지 AIV 신속진단>

□ 기술 차별성

- 국내 AI 진단기술 현황 :
 - 실시간 유전자 진단법(RT-PCR)이 현재 전국 39개소 진단기관에서 상시에찰에 활용중이며, 크로마토그래피법을 적용한 현장진단 키트 사용 중
 - 국내에서 H5/H7형 동시 검출가능한 멀티 진단키트를 개발하였으나, 가금(오리, 닭) 한정으로 진단 가능하며, **민감도 및 특이도 문제로 현재 야생철새 대상 사용 불가**
- 철새들이 주로 활동하는 수중환경에서 드론 및 로봇 등을 사용하여 **신선한 분변 및 이를 고농도로 포함한 물 샘플 확보 가능** ▶ 현장에서 AIV 진단 가능(기존 2~3일 소요)
- 현장신속진단기술 활용을 통한 질병조기검출 및 통제전략 확립 가능

○ 연구자 유치 및 파견

- 교수 3명, 석박사급 인력 2명 이상 유치 및 파견
- 조기검출 시스템 개발 연구, 문헌 및 현장조사, 현장 샘플 채취 분석 등
- 공동연구 및 향후 방안 협의



<일본 CADIC 방문>



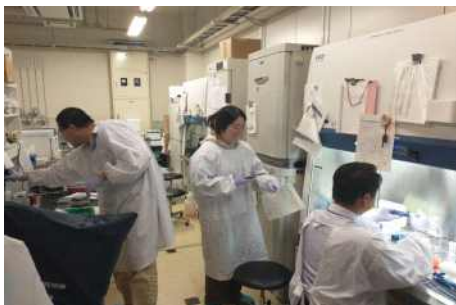
<한국 CAD 방문>

○ 한·일 양국 단기연수 프로그램 운영

| 구분 | 한국 | 일본 |
|------|---|--|
| 프로그램 | <ul style="list-style-type: none"> - 23.03.04.~09.(6일) - 환경수 샘플링 검출 현장조사 - 고품질 샘플 채취법 등 교육 - 바이러스 농축기술 등 교육 | <ul style="list-style-type: none"> - 23.04.20.~26.(6일) - 현장 샘플링 - 고품질 샘플 확보체계 확립 - 환경수중 바이러스 농축기술 확립 |



<국내 단기연수 프로그램 유치>



<일본 단기연수 프로그램 파견>

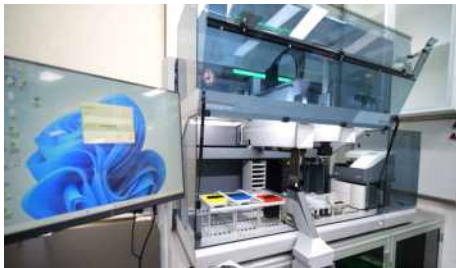
○ 해외 전문가 인력 POOL 구축

- 일본 현지 전문가 인력(CADIC 센터장 외 박사 9인) 확보

| No. | 성명 | 소속 및 직급 | 전문분야 |
|-----|-------------------|----------------|-------|
| 1 | Ayako Yoshida | CADIC 센터장 | 수역기생충 |
| 2 | Tamaki Okabayashi | CADIC 부센터장 | 수역미생물 |
| 3 | Junzo Norimine | CADIC 교수 | 수의면역 |
| 4 | Kentaro Yamada | CADIC 부교수 | 수의전염병 |
| 5 | Akatsuki Saito | CADIC 부교수 | 수의병리 |
| 6 | Satoshi Sekiguchi | CADIC 부교수 | 수의병리 |
| 7 | Hirohisa Mekata | CADIC 부교수 | 수의병리 |
| 8 | Horimoto Taisuke | 동경대 농학부 수의학과 | 수역미생물 |
| 9 | Yasushi Kawaguchi | 동경대 의과학연구소 부소장 | 수역미생물 |
| 10 | XUAN Xuenan | 오비히로 원충병연구소 소장 | 수역미생물 |

○ 한·일 연구장비 공동활용

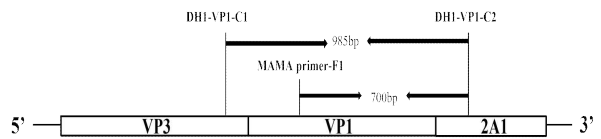
- BL2시설 활용 및 전임상실험 / 자동진단 분석장비 기술지도
- 최신 연구동향에 적합한 분석 및 진단기기 정보 제공



<한-일 공동 진단 및 실험기기 활용>

○ 개발 기술 기반의 특허 출원

- 오리 간염 바이러스-1의 백신주 및 야외주 감별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 감별방법
- 출원번호 : 10-2024-0015596(24.02.01.)



<개발 기술 기반 특허출원>

○ 국제 학술대회 발표



<23년 대한수의학회 추계 국제 학술대회, 우수발표상 수상>

Evaluation of long-lasting humoral immune response induced by recombinant herpesvirus of turkey (HVT) expressing hemagglutinin protein of Y280-lineage of H9N2 avian influenza virus (AIV) by using the NHEJ-CRISPR/Cas9 system

Presenter : Sang-Won Kim
Corresponding author : Min Kang

Department of Veterinary Infectious Diseases and Avian Diseases,
College of Veterinary Medicine and Center for Avian Diseases, Jeonbuk National University, South Korea

Evaluation of recombinant herpesvirus of turkey (HVT) expressing VP2 protein of antigenic variant infectious bursal disease virus (avIBDV) by using the NHEJ-CRISPR/Cas9 system

Presenter : Jong-Yeol Park
Corresponding author : Se-Youon Cha

Department of Veterinary Infectious Diseases and Avian Diseases,
College of Veterinary Medicine and Center for Avian Diseases, Jeonbuk National University, South Korea



<한국가금학회 2023년 추계 학술대회, 우수논문 발표상 수상>

| 구분 | 내용 |
|---------------------|--|
| 대한수의학회 추계국제 학술대회 | <ul style="list-style-type: none"> - 일시 : 23.11.29.~12.02. - 구두발표 및 우수상 수상 * LPAI Y280 단백질 발현 HVT 백신 평가 * IBDV VP2 단백질 발현 HVT 백신 평가 |
| 한국가금학회 | <ul style="list-style-type: none"> - 일시 : 23.11.17.~18. - 구두발표 및 우수상 수상 * LPAI Y280 및 IBDV VP2 단백질 발현 HVT 백신 평가 * LPAI Y280 단백질 발현 HVT 백신의 안전성 |

○ 공동연구결과 SCI 급 논문 발표

- 국내 및 일본에서 분리된 APMV 유전적 특성에 관한 논문 등 발표

vaccines MDPI

Article
Development of a Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Herpesvirus of Turkey-Based Vaccine against Novel Variant Infectious Bursal Disease Virus

Jun-Feng Zhang ^{1,†}, Jong-Yeol Park ^{2,†}, Sang-Won Kim ³, Yu-Ri Choi ², Se-Youon Cha ², Hyung-Kwan Jang ^{2,3}, Bai Wei ^{2,*} and Min Kang ^{2,3,*}

<Vaccines, '24.02.23>

frontiers | Frontiers in Veterinary Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 13 May 2024
doi: 10.3389/fvets.2024.128598

OPEN ACCESS
EDITED BY
Paul H. Coulson,
Michigan State University, United States
REVIEWED BY
Samantha Scott,
University of Agriculture,
Faisalabad, Pakistan
Taeyoung Kim,
Agricultural Research Service, USDA,
United States
*CORRESPONDENCE
Se-Youon Cha
seyouon@jnu.ac.kr
Min Kang
minkang@jnu.ac.kr
RECEIVED 14 February 2024
ACCEPTED 22 April 2024
PUBLISHED 13 May 2024

Simultaneous construction strategy using two types of fluorescent markers for HVT vector vaccine against infectious bursal disease and H9N2 avian influenza virus by NHEJ-CRISPR/Cas9

Jun-Feng Zhang^{1,†}, Ke Shang¹, Sang-Won Kim¹, Jong-Yeol Park², Bai Wei¹, Hyung-Kwan Jang^{1,3}, Min Kang^{1,4*} and Se-Youon Cha^{2*}

<Frontiers, '24.05.13.>

animals MDPI

Article
Genetic Characterization of Avian Paramyxovirus Isolated from Wild Waterfowl in Korea between 2015 and 2021

Yea-Jin Lee ^{1,†}, Jong-Yeol Park ^{1,†}, Ke Shang ¹, Jun-Feng Zhang ¹, Yu-Ri Choi ¹, Sang-Won Kim ¹, Se-Youon Cha ¹, Min Kang ^{1,2}, Bai Wei ^{1,*} and Hyung-Kwan Jang ^{1,2,*}

<Animals, '24.03.01.>

animals MDPI

Article
Protection of Chickens against H9N2 Avian Influenza Isolates with a Live Vector Vaccine Expressing Influenza Hemagglutinin Gene Derived from Y280 Avian Influenza Virus

Jun-Feng Zhang ^{1,2,†}, Sang-Won Kim ^{1,†}, Ke Shang ^{1,3}, Jong-Yeol Park ¹, Yu-Ri Choi ¹, Hyung-Kwan Jang ^{1,4}, Bai Wei ¹, Min Kang ^{1,4,*} and Se-Youon Cha ^{1,4*}

<Animals, '24.03.12.>

○ 공동 세미나 및 워크숍

| 구분 | 내용 |
|------------|--|
| 세미나 워크숍 | - 한·일 야생조류 유래 질병발생 현황 및 역학상황(23.04.23, 한국) - ‘초국경 동물질병 통제’ 세미나(23.03.08, 일본) - 온라인 정기 세미나(분기별 1회, ZOOM 활용, 프로젝트 수행현황 점검 등) |

○ 방역시스템 개선 정책제안

| | | |
|------|---|--|
| 제안명 | - 농장별 맞춤형 오리리메렐라 감염증 백신 제조 및 활용 | |
| 주관부처 | - 농림축산검역부 연구기획과 | |
| 시책명 | - 오리 리메렐라 감염증 백신 제조 및 활용 | |
| 건의일자 | - 24.04.23. | |
| 건의내용 | - 오리농장별 맞춤형 백신 개발 및 농가 활용 | |
| 기대효과 | - 농장별 유행주에 대한 맞춤형 백신제제 개발로 최적의 예방효과 기대 - 리메렐라의 근본적인 예방 대책 수립으로 항생제 사용 저감 | |

○ 검출시스템 및 감시체계 구축을 위한 관계기관 협의 예정

- 정책부서, 생산자 단체, 계열사, 동물용의약품 회사 등 자문위원회 개최
- 운영계획

| 구분 | 주요 내용 | 비고 | |
|-----|------------------------|------------------|--|
| 정기 | 상반기 | 수행사항 점검 및 기술검토 등 | |
| | 하반기 | 중간점검 및 개선방안 협의 | |
| 비정기 | 주관 및 공동연구기관 협의하에 수시 개최 | | |

→ 현장 수요 맞춤형 기술 개발 및 인허가, 규제 등 분야별 전문 자문단 구성 및 (비)정기 자문위원회 개최로 현장 적용 가능한 기술 및 산업화를 추진하고자 함

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

| 성과지표명 | | 단계 | 1년차 | 2년차 | 종료 후 | 계 | 가중치 (%) |
|--------------------|---------------|---------|-----|-----|-------|--------|---------|
| | | | | | | | |
| 전담기관 등록·기탁지표 | 논문(SCI) | 목표(단계별) | 2 | 4 | | 6 | |
| | | 실적(누적) | | 4 | | 4 | |
| | 논문(비SCI) | 목표(단계별) | | | | | |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | |
| | 학술발표 | 목표(단계별) | 2 | 3 | | 5 | 15 |
| | | 실적(누적) | 3 | 4 | | 7 | |
| | 특허출원 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 30 |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | |
| | 특허등록 | 목표(단계별) | | | 1 | 1 | |
| | | 실적(누적) | | | | | |
| | 품종등록 | 목표(단계별) | 2 | 3 | | 5 | 30 |
| | | 실적(누적) | 2 | 3 | | 5 | |
| | 기술이전 (백만원) | 목표(단계별) | | | 1(10) | 1(10) | |
| | | 실적(누적) | | | 1(20) | 1(20) | |
| 연구개발과제 특성 반영 지표 | 인력양성 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 10 |
| | | 실적(누적) | | 2 | | 2 | |
| | 교육지도 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 5 |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | |
| | 정책활용 | 목표(단계별) | | 1 | | 1 | 10 |
| | | 실적(누적) | | 1 | | 1 | |
| | 포상 및 수상 | 목표(단계별) | | | | | |
| | | 실적(누적) | 1 | 2 | | 3 | |
| | 홍보 | 목표(단계별) | | | | | |
| | | 실적(누적) | 2 | 1 | | 3 | |
| | 기타 | 목표(단계별) | | | | | |
| | | 실적(누적) | 1 | 1 | | 2 | |
| | 계 | 목표 | 6 | 14 | 2 | 22 | |
| | | 실적 | 9 | 17 | 1(20) | 28(20) | |

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCIE 여부 (SCIE/ 비SCIE) | 게재일 | 등록번호 (ISSN) | 기여율 |
|----|---|----------|-------------------|---|------|--------|-----------------------------|------------|----------------|------|
| 1 | Genetic characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus (IBDV) from in chickens in Korea | 한국가금학회지 | Park JY | 4 | 대한민국 | 한국가금학회 | 비SCIE | 2023.12.31 | 1225-6625 | 0.33 |
| 2 | Development of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated herpesvirus of turkeys-based vaccine against novel variant infectious bursal disease virus | Vaccines | Zhang JF, Park JY | 3 | 스위스 | MDPI | SCIE | 2024.02.23 | 2076-393X | 0.5 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------|------------------------|---|-----|--------------------|------|-----------|-----------|-----|
| 3 | Genetic characterization of avian paramyxovirus isolated from wild waterfowls in Korea between 2015 and 2021 | Animals | Wei B et al | - | 스위스 | MDPI | SCIE | 24.03.01 | 2076-2615 | 0.5 |
| 4 | Protection of Chickens against H9N2 Avian Influenza Isolates with a Live Vector Vaccine Expressing Influenza Hemagglutinin Gene Derived from Y280 Avian Influenza Virus | Animals | Zhang JF, Sang-Won Kim | - | 스위스 | MDPI | SCIE | 24.03.12 | 2076-2615 | 0.5 |
| 5 | Simultaneous construction strategy using two types of fluorescent markers for HVT vector vaccine against infectious bursal disease and H9N2 avian influenza virus by NHEJ-CRISPR/Cas9 | Frontiers | Zhang JF, Ke Shang | - | 스위스 | FRONTIERS MEDIA SA | SCIE | 24.05.12. | 2297-1769 | 0.5 |

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|--|---------------|-------------|---|------|
| 1 | The 12 th Center for Animal Disease Control International Symposium | Cha SY et al | 2022.11.16. | 330 th Anniversary Exchange Hall, University of Miyazaki | 일본 |
| 2 | (사)대한수의학회 2022년 추계국제학술대회 | Park JY et al | 2022.11.17. | 제주국제컨벤션센터 | 대한민국 |
| 3 | (사)대한수의학회 2022년 추계국제학술대회 | Choi YR et al | 2022.11.17. | 제주국제컨벤션센터 | 대한민국 |
| 4 | 2023 한국가금학회 제40차 정기총회 및 학술발표회 | Kim SW et al | 2023.11.17. | 전북대학교 특성화캠퍼스, 웨스턴라이프호텔 | 대한민국 |
| 5 | 2023 한국가금학회 제40차 정기총회 및 학술발표회 | Park JY et al | 2023.11.17. | 전북대학교 특성화캠퍼스, 웨스턴라이프호텔 | 대한민국 |
| 6 | (사)대한수의학회 2023년 추계국제학술대회 | Park JY et al | 2023.12.01. | 제주국제컨벤션센터 | 대한민국 |
| 7 | (사)대한수의학회 2023년 추계국제학술대회 | Kim SW et al | 2023.12.01. | 제주국제컨벤션센터 | 대한민국 |

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

| 번호 | 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명 | 등록/기탁 번호 | 등록/기탁 기관 | 발생 연도 |
|----|--------------------------------|----------|----------|-------|
| 1 | Influenza A virus(A21-WB-F-54) | OQ132764 | NCBI | 2022 |
| 2 | Influenza A virus(A21-WB-F-56) | OQ132765 | NCBI | 2022 |
| 3 | Influenza A virus(FQ1593-4) | OR794291 | NCBI | 2023 |
| 4 | Influenza A virus(FQ363-5) | OR794201 | NCBI | 2023 |
| 5 | Influenza A virus(FQ2132-4) | OR794004 | NCBI | 2023 |

[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 | 등록인 | 등록일 | 등록 번호 | | |
| 1 | 오리 간염 바이러스의 백신주와 야외주를 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도 | 대한민국 | (주)바이오드, 전북대학교 산학협력단 | 2024.02.01 | 10-2024-015596 | | | | 0.5 | |

[경제적 성과]

□ 기술 실시(이전)

| 번호 | 기술 이전 유형 | 기술 실시 계약명 | 기술 실시 대상 기관 | 기술 실시 발생일 | 기술료 (해당 연도 발생액) | 누적 징수 현황 |
|----|----------|---|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| 1 | 특허양도 | 오리 간염 바이러스의 백신주와 야외주를 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도 | (주)바이오드 | 2024.02.06. | 20,000,000원 | 20,000,000원 |

[사회적 성과]

□ 정책 활용 내용

| 시책명 | 부처 | 제안일 |
|--|---------|-----------|
| 오리 간염 바이러스 1형의 백신주 및 야외주 감별방법이 개선된 표준진단법 | 농림축산식품부 | 24.04.23. |

□ 전문 연구 인력 양성

| 번호 | 분류 | 기준 연도 | 현황 | | | | | | | | | | | |
|----|------|-------|-----|----|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|--|
| | | | 학위별 | | | | 성별 | | 지역별 | | | | | |
| | | | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 충청권 | 영남권 | 호남권 | 기타 | |
| 1 | 취업 | 2023 | | | | 1 | | 1 | | | | | 1 | |
| 2 | 학위취득 | 2024 | | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | |

□ 교육지도

| 번호 | 교육명 | 일시 | 장소 | 대상 | 교육자 |
|----|------------------|-------------|-----------|--------------------|-----|
| 1 | 2023년 역학조사관 실무교육 | 2023.09.05. | 대전 선샤인 호텔 | 농림축산검역본부 역학조사관 11명 | 강민 |

□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|-------|-----------------|-----------------------------------|---------|
| 1 | 인터넷신문 | 한국경제 외 | 전북대, 철새 바이러스 대응 위해 중국·일본연구소와 '맞손' | 2022.04 |
| 2 | 인터넷신문 | 전북대학교 Newplus 외 | 김상원 대학원생, 대한수의학회 우수발표상 수상 | 2022.12 |
| 3 | 인터넷신문 | 대학 in 외 | 박종열 전북대 박사과정생, 가금학회 '우수 발표상' 수상 | 2023.12 |

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|----|------------------------------|--|-------|-------------|-----------|
| 1 | 수상 | Excellent Presentation Merit | Evaluation of rapid antigen detection kits for the diagnosis of H5N8 highly pathogenic avian influenza virus infection in Pekin ducks (<i>Anas platyrhynchos</i>) | 김상원 | 2022.11.17 | (사)대한수의학회 |
| 2 | 수상 | 우수논문발표상 | Evaluation of recombinant herpesvirus of turkey (HVT) expressing VP2 protein of antigenic variant infectious bursal disease virus (avIBDV) by using the NHEJ-CRISPR/Cas9 system | 박종열 | 2023.11.16. | 한국가금학회 |
| 3 | 수상 | Excellent Presentation Merit | Construction and evaluation of recombinant herpesvirus of turkey (HVT) expressing VP2 protein of antigenic variant infectious bursal disease virus (avIBDV) and HA protein of Y280-lineage of H9N2 avian influenza virus (AIV) | 박종열 | 2023.11.30. | (사)대한수의학회 |

□ MOU 체결

| 번호 | 체결 기관 | 체결일 | 주요 내용 |
|----|-----------------------------|-------------|-------------------------------------|
| 1 | 일본 미야자키대학 산업동물방역연구센터(CADIC) | 2022.07.12. | 연구원 및 학생 교류, 공동연구 등 |
| 2 | 농촌진흥청 국립축산과학원 가금연구소 | 2023.06.12. | 가금산업 현장의 질병 및 사양관리 현황 파악 등 협력 방안 마련 |

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도(%) |
|---|---|--------|
| 한-일 조류인플루엔자(AI) 및 파라믹소 바이러스(APMV) 모니터링 | ○ 국내의 야생조류 및 가금농장 질병 모니터링 ○ 일본 야생조류에 대한 질병 모니터링 ○ 모니터링 기술 체계화 | 100 |
| 유전체 전장 분석을 통한 특성연구 (분자역학 분석 및 바이러스 진화 규명) | ○ 유전체 전장 분석 및 분리주 위험도 평가 | 100 |
| 야생철새 전파 바이러스 조기검출 시스템 개발 및 현장 실증 | ○ 실험실내 유효성검증 및 신규 조기진단기술 현장 실증 | 100 |
| 국제협력 시스템 구축 | ○ 협약, 연구자 유치 및 파견, 한일 양국 단기연수 프로그램 운영 | 100 |

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- GeneBank구축으로 국내 진단, 백신 및 치료제 개발을 위한 핵심 유전자원 확보
- 고위험 국내 유입 가능 감염병의 잠재적 위협을 차단하는데 기여함으로써 국내 유입시 효과적이고 신속한 대응이 가능 ▶ 경제적 손실감소 및 사회불안 해소
- 한-일 상시 공동연구 시스템 구축으로 동아시아 지역 포괄하는 공동 가축방역 체계 구축 기반 마련 및 국제적 영향력 향상에 기여
- 국제협력 시스템 구축을 위해 연구자 유치 및 파견, 연수 프로그램 개발, 해외 연구자 풀을 구축하고 공동 세미나와 워크숍, 성과교류회와 함께 다수의 연구성과를 배출

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- '24년 4월, 후속사업인 가축질병협력체계 고도화 사업 수주
- 기존 연구과제로 구축된 연구성과 및 인프라를 활용, 동등 이상의 선진국 핵심 질병진단기술 국산화 추진
- 국내 진단키트 전문개발 벤처기업인 포스트바이오와 공동연구를 통해 기존 일본 상용화 제품의 민감도 및 진단성능을 개선한 휴대용 모바일 고속 qPCR 연구개발
- 기존 참여연구기관인 일본 CADIC과의 국제연구 인프라 지속 유지 및 관리(기구추구 AI 예찰 진단법 기술 공유 및 자문, 기술평가 분석지원 등)
- 진단에 필요한 비용과 시간 등 절약으로 현장신속대응 등 국내 방역역량 강화 기대

< 연구개발성과 활용계획 >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 |
|--------------------|------|-----------------|
| 특허등록 | 국내 | 1 |
| | 계 | 1 |
| 사업화 | 기술이전 | 1건(1천만원) |
| | 계 | 1건(1천만원) |

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.