

(옆면)

(앞면)

RS-2020
-IP3200
05

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농식품 기술융합 창의인재양성사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004675-01

현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한
최신의 동물감염병 방역기술 개발 최종보고서

현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한 최신의 동물감염병 방역기술 개발

2024.07.03

주관연구기관 / 충북대학교 산학협력단
공동연구기관 / 전북대학교 산학협력단
건국대학교 산학협력단
(주)중앙백신연구소
서울대학교 산학협력단

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한 최신의 동물감염병 방역기술 개발”(개발기간 : 2020.01.31. ~ 2024.01.30.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.07.03

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (조영철)
공동연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (손정민) (인)
건국대학교 산학협력단 (윤동열) (인)
(주)중앙백신 연구소 (윤인중)
서울대학교 산학협력단 (김재영)

주관연구책임자 : 이완규 (인)

공동연구책임자 : 장형관 (인)

류영수 (인)

강신영 (인)

김단일 (인)

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

< 요약 문 >

사업명		농식품기술융복합 창의인재 양성사업			총괄연구개발 식 별번호				
내역사업명		동물감염병 분야			연구개발과제번호		RS-2020-IP320005		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	수의전염병	50 %	수의 미생물/기생생물	30%	동물 질병예 방	20%		
	농림식품과학 기술분류	RB	50 %	RB02	20%	RB0201	10%		
총괄연구개발명		농식품기술융복합 창의인재 양성사업							
연구개발과제명		현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한 최신의 동물감염병 방역기술 개발 Development of a state-of-the-art technique of preventing animal infectious diseases with the purpose of training quarantine experts in practical issues							
전체 연구개발 기간		2020. 01. 31 - 2024. 01. 30 (4년)							
총 연구개발비		총 10,644,000 천원 (정부지원연구개발비: 8,000,000천원, 기관부담연구개발비 : 994,000천원, 지방자치단체: 770,000천원, 그 외 지원금: 880,000천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[] 기타 (위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형									
연구개발과제 특성									
연구 개발 목표 및 내용	최종 목표	전국단위 수의방역대학원 연합체계를 구축하여 동물감염병 분야 선진국 수준의 체계적인 교육 연구기관으로 위상을 구축하며, 더 나아가 각 산업체와 공동연구를 통한 산업화 단계로 발전시켜 나감을 연구개발 목표로 함							
	전체 내용	<p>○ 교육분야 - 수의방역대학원 설립 특수대학원 교육체계는 1) 현장어로 및 해결중심 교육과정 편성 및 운영, 2) 기초-예방-임상 융합교육 강화, 3) 첨단핵심기술 연구개발과 산학교육과정 연계, 4) 지역사회 연계 특화교과목 개설, 5) 학점공용제를 통한 타권역 특수대학원 연합교육시스템 구축 등을 통해 이루고자 하며 이를 통해 현장중심 방역전문가를 양성하고자 함</p> <p>○ 연구분야 - 현장문제 기반 연구주제 양돈, 가금 및 축우 산업의 경제성을 고려한 축산농가 현장에서의 시급한 문제점을 해결하고자, 동물감염병 방역 현장중심 해결형 연구기법을 개발함</p> <p>- 양돈분야: 돼지 소화기계 세균성 감염병, 아프리카 돼지 열병, PRRS 바이러스 감염병</p> <p>- 가금분야: 아데노 바이러스 감염병, HPAI, ND 등의 고병원성 감염병, 가금 호흡기계 세균성 감염병</p> <p>- 축우분야: 젖소 소모성 감염병(류코시스, 요네병)</p> <p>- 역학분야: ICT 융합 동물감염병 관리시스템, 감염병 매개체 진단기 특성분석, 인수공통감염병 분자역학</p>							
	1단계	목표	인력양성: 현장문제 해결형 방역사 및 수의사 양성 프로그램 구축 기술개발: 동물감염병 중심의 질병진단, 방역, 역학 최신기법 개발						
	내용	특수대학원 설립 인력양성: 연간 20명, 2026년 최종 80명 이상 석사 배출 특수대학원 운영: 참여대학 10개 교과목 총 30개 교과목 개발, 6학점 공통과목 이수, 연구개발 참여를 통한 졸업논문 연계, 12학점 선택과목 이수, 원격 화상강의 인프라 구축을 통한 연합교육실시 기술개발: 동물감염병 질병진단 특화 기법 개발, 동물감염병 방역 특화 기법 개발, 동물감염병 분자역학 특화 기법 개발							
	2단계	목표	인력양성: 현장문제 해결형 방역사 및 수의사 양성 프로그램 구축 기술개발: 동물감염병 중심의 질병진단, 방역, 역학 최신기법 개발						
	내용	인력양성: 연간 20명, 2026년 최종 80명 이상 석사배출 특수대학원 운영: 참여대학 10개 교과목 총 30개 교과목 개발, 6학점 공통과목							

이수, 연구개발 참여를 통한 졸업논문 연계, 12학점 선택과목 이수, 원격 화상강의 인프라 구축을 통한 연합교육실시
기술개발: 가축 소모성 질환 중심, 국가재난형 감염병 대응 기술 중심, 인수공통전염병 병원체의 역학조사 및 진단키트 개발

연구개발성과
-최신기술을 겸비한 전문가 양성 및 방역체계 저변 확대를 통한 국민불안 해소 및 사회안정
-고위험성 감염병 방역 플랫폼 구축을 통한 신규 감염병 대처방안 마련
-동물감염병 선도분야의 산학공동연구개발을 통한 산업화 및 일자리 창출
-지역산업체 활성화를 통한 지역경제 안정 도모

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과
○교육분야
-수의방역대학원 설립, 30개 교과목 개발, 원격강의를 통한 공동캠퍼스 운영, 현장실습 고도화, 공무원 동물방역 on-site 프로그램 및 산업협력 프로그램
-수의방역학 석사학위 소지 현장 방역전문가 66명 배출 및 비정규 수료생 225명 배출
○연구분야
-양돈분야: 돼지 세균성 질환 진단키트, ASF차단 방역 매뉴얼, 아프리카 열병 및 구제역 백신의 실용화, PRRS 저항성 K418MD 개발
-가금분야: 아데노 다가백신 개발 및 산업화, 호흡기 및 소화기 바이러스 감염증 동시 진단법 개발, 호흡기계 세균성 진단법 개발
-축우분야: 우군 청정화 SOP 개발
-역학분야: 발병 및 확산 예측 모델 개발, 매개체 진드기 백신 하우언 개발, 인수공통 감염병 신속진단 키트 개발

연구개발성과의 비공개여부 및 사유
(해당 시 작성) : 영 제35조 제2항 각 호의 어느 하나에 해당하는 기술인 경우 '비공개'로 기재하고 그 사유를 작성합니다.

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
93	36							7				

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호
충북대학교 산학협력단	DNA서열분석기Deoxyribonucleic acid sequence analyzers	Miseq system	1	2021-01-20	79,061		충북대학교 수의과대학 E12-1동	NFEC-2021-02-268063	
충북대학교 산학협력단	자동핵산추출시스템Nucleic acid extractors	Maxwell RSC 48	1	2021-08-06	55,000		충북대학교 수의과대학 E12-1동	NFEC-2021-08-272455	
충북대학교 산학협력단	전기영동장치4150 TapeStation	4150 Tape Station	1	2022-01-13	49,500		충북대학교 수의과대학 E12-1동	NFEC-2023-03-286673	

국문핵심어 (5개 이내)	동물감염병	질병진단	방역	역학	현장중심
영문핵심어 (5개 이내)	Animal infectious disease	Disease diagnosis	Quarantine	Epidemiology	Field-oriented

〈 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)

최종보고서										보안등급 일반 [√], 보안 []			
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명	사업명			농식품기술융복합 창의인재 양성사업				
전문기관명		농림식품기술기획평가원			내역사업명	내역사업명			동물감염병 분야				
공고번호		2019-516호			총괄연구개발 식별번호								
					연구개발과제번호			RS-2020-IP320005					
기술 분류	국가과학기술표준분류	수의전염병		50%	수의 미생물/기생생물		30%	동물 질병예방		20%			
	농림식품과학기술분류	RB		50%	RB02		20%	RB0201		10%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	농식품 기술융합 창의인재양성사업										
		영문	Educating Creative Global Leader										
연구개발과제명 주관연구개발기관 연구책임자		국문	현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한 최신의 동물감염병 방역기술 개발										
		영문	Development of a state-of-the-art technique of preventing animal infectious diseases with the purpose of training quarantine experts in practical issues										
		기관명			충북대학교 산학협력단			사업자등록번호			301-82-16304		
		주소						법인등록번호					
		성명		이완규			직위		교수				
		연락처	직장전화				휴대전화						
	전자우편				국가연구자번호	1008 6433							
연구개발기간		전체	2020. 01. 31 - 2024. 01. 30 (4년)										
		단계	1단계	2020. 01. 31 - 2022. 01. 30 (2년)									
			2단계	2022. 01. 31 - 2024. 01. 30 (2년)									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계		
총계		8,000,000	126,800	867,200	770,000		880,000		9,776,800	867,200	10,644,000		
1단계		1년차	2,000,000	31,700	216,800	200,000		220,000		2,451,700	216,800	2,668,500	
		2년차	2,000,000	31,700	216,800	170,000		220,000		2,421,700	216,800	2,668,500	
2단계		1년차	2,000,000	31,700	216,800	200,000		220,000		2,451,700	216,800	2,668,500	
		2년차	2,000,000	31,700	216,800	200,000		220,000		2,451,700	216,800	2,668,500	
공동연구개발기관 등		기관명		책임자	직위	휴대전화		전자우편			비고		
											역할		
											기관유형		
공동연구개발기관		충북대학교 산학협력단		이완규	교수						주관		
		전북대학교 산학협력단		장형관	교수						공동		
		건국대학교 산학협력단		류영수	교수						공동		
		(주)중앙백신연구소		강신영	고문						협동		
위탁연구개발기관		서울대학교 산학협력단		김단일	교수						협동		
		(주)터보소프트		송제민	대표						위탁		
연구개발기관 외 기관		(주)메디안디노스틱		이진아	팀장						참여		
연구개발과제 실무담당자		성명	박종희			직위		주임					
		연락처	직장전화				휴대전화						
			전자우편				국가연구자번호						

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

2024 년 3 월 20 일

연구책임자: 이 완 규 (인)

주관연구개발기관의 장: 조 영 철 (직인)

공동연구개발기관의 장: 손 정 민 (직인)

공동연구개발기관의 장: 윤 동 열 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 송 제 민 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

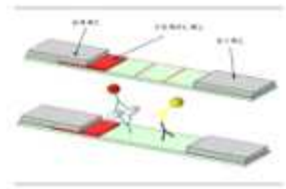
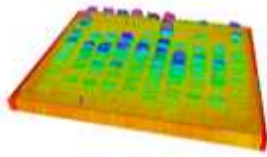
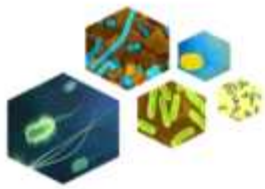
1. 연구개발과제의 개요

○ 1-1세부

세부과제번호	제 1-1 세부과제								
세부 연구과제명	국문	돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발							
	영문	Development of a Diagnostic Method and the Characteristics of Bacterial Infectious Disease in Porcine Digestive System							
세부 연구책임자	한글성명	이 완 규	영문성명	Wan-Kyu Lee	과학기술인 등록번호	1008 6433			
	소속기관	충북대학교	부서명 (학과명)	수의과대학	직위	교수			
	전화번호		팩스번호		E-mail				
연구기간	2020 년 1 월 31 일 부터 ~ 2024 년 1 월 30 일 까지 (4년)								
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	6차년도	7차년 도	합계
	정부출연금	452,625	452,625	452,625	452,625				1,810,500
	기업부담금								
	기타	150,000	120,000	150,000	150,000				570,000
	합계	602,625	572,625	602,625	602,625				2,380,500
참여연구인력 (단위:명)	책임급	선임급		원급이하			합계		
	5	0		32			37		

최종 목표	돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 이를 통한 신속진단법 개발
----------	---------------------------------------

- 국내 양돈장에서 중요한 세균성 소화기계 감염병 원인체의 특성조사 및 감염 실태를 조사하고, 분리균에 대한 병원성 인자 및 분자생물학적 특성조사 결과를 바탕으로 신속진단검출기법 개발을 함으로써 최종적으로 현장에 적용할 수 있는 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발을 최종 목표로 함



**2020
(1차년도)**

- 1. 감염병 원인체 특성 조사 및 분리주 유전자 확인**
- 마생물학적 특징조사
 - 병리조직학적 특성조사
 - 항생제 감수성 및 내성인자 조사
 - 병원균 분포조사 및 유전자형 확보

**2021
(2차년도)**

- 2. 항원 병원성유전자 검색을 통한 분자생물학적 특성조사**
- 균종별 병원성인자 조사
 - 유행물론의 다양성 확인
 - 유전학적 상동성 분석

**2022
(3차년도)**

- 3. 감염병 원인균 신속진단검출기법 개발**
- Multiplex PCR Primer 제작
 - Multiplex PCR법 개발
 - 유용성 및 교차반응 검사

**2023
(4차년도)**

- 4. 감염병 신속진단 키트 개발**
- 신속진단 키트 개발
 - 현장 적용 효능 평가

○ 1-2세부

세부과제번호	제 1-2 세부과제					
세부 연구과제명	국문	돼지 생식기계 감염병 관리 및 ICT융합 동물감염병 관리시스템 개발				
	영문	Development of ICT Converged System for Monitoring of Animal Infectious Diseases				
세부 연구책임자	한글성명	현 상 환	영문성명	Sang-Hwan Hyun	과학기술인 등록번호	1010 1356
	소속기관	충북대학교	부서명 (학과명)	수의과대학	직위	교수
	전화번호		팩스번호		E-mail	
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)					
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	합계
	정부출연금	322,375	322,375	322,375	322,375	1,289,500
	기업부담금					
	기타	50,000	50,000	50,000	50,000	200,000
	합계	372,375	372,375	372,375	372,375	1,489,500
참여연구인력 (단위:명)	책임급	선임급		원급이하		합계
	5	1		8		14

최종 목표	돼지 생식기계 감염병 관리 및 ICT 융합 동물감염병 관리 시스템을 통한 동물감염병 조기 진단/방역 시너지 효과 창출
-------	---

○ 1-1협동

협동과제번호	제 1-1 협동과제					
세부 연구과제명	국문	가금 아데노바이러스 다가백신 개발 및 백신프로그램 작성				
	영문	Development of fowl adenovirus multivalent vaccines and proposal of vaccination programs				
세부 연구책임자	한글성명	강신영	영문성명	Shien-Young Kang	과학기술인 등록번호	1010 5089
	소속기관	(주)중앙백신 연구소	부서명 (학과명)	중앙백신	직위	고문
	전화번호		팩스번호		E-mail	
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)					



<그림 17> 세부1-2 연구개발과제의 연차별 목표 및 내용

본 연구개발 과제인 “가금 아데노바이러스 다가백신 개발 및 백신프로그램 작성”은 국내 양계산업에 지속적으로 피해를 일으키고 있는 가금 아데노바이러스 감염증의 방어를 위한 다가백신을 개발하고 농림축산검역본부의 품목허가를 득하여 산업화 시키는 것이다.

국내 가금 병성감정결과에 따르면 전체 가검물의 약 10% 수준에서 가금 아데노바이러스에 의한 피해가 확인되고 있으며 이를 방어하기 위한 시판 백신은 Serotype 4에 대한 백신이다. 본 연구팀의 1차년도 성과인 가금 아데노바이러스 국내 발생현황 조사 논문에 따르면 국내 가장 우점 혈청형인 4형이 백신 사용에 따라 점차 감소하고 8b형, 11형의 발생이 증가하는 현황이다. 따라서 본 연구팀은 국내 유행하는 가금 아데노바이러스를 대부분 방어할 수 있는 4형, 8b형, 11형 3가지 혈청형의 항원을 포함하는 다가 백신을 개발하기로 하였다.

1) 연구개발의 개요

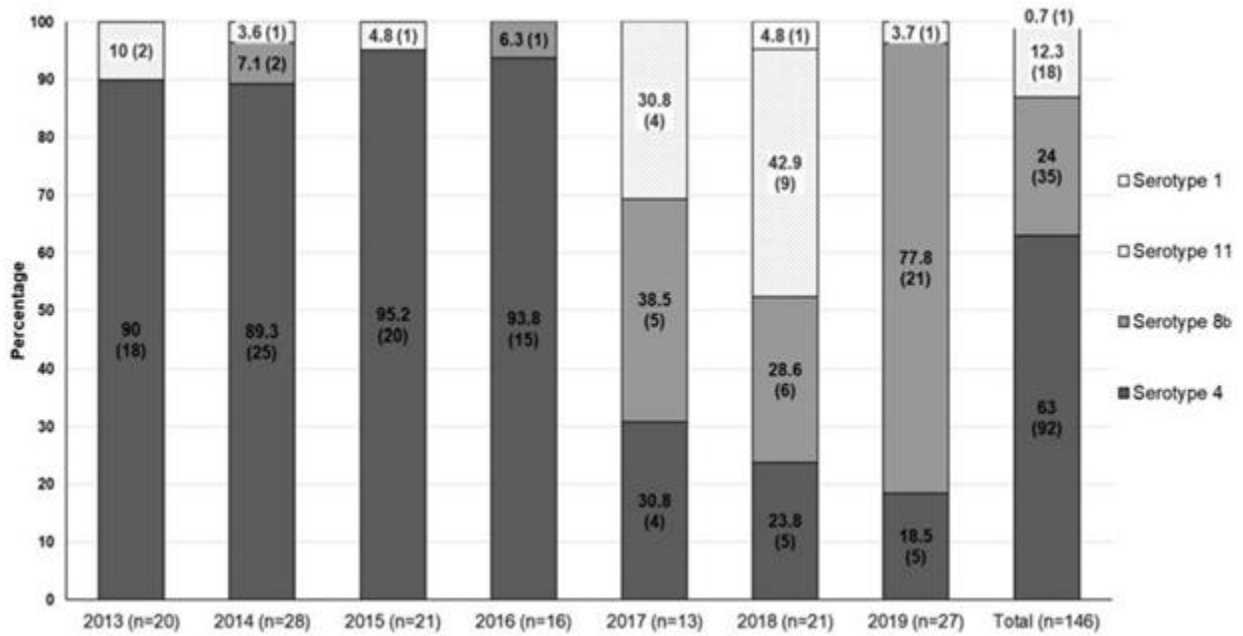
가. 가금 아데노바이러스 감염증(Fowl adenovirus infection)

- 가금 아데노바이러스 감염증은 봉입체성 간염(Inclusion body hepatitis)이라고도 불리는 닭의 질병으로 그룹 1 가금 아데노바이러스에 의하여 발병되는 전염병이다.
- 그룹 1 가금 아데노바이러스는 총 12개의 혈청형(1~7, 8a, 8b, 9~11)이 존재하며 국내 양계산업에 주로 피해를 주는 혈청형은 4형, 8b형, 11형이고, 간헐적으로 근위에 병변을 일으키는 1형도 발생하는 것으로 알려져있다.
- 가금 아데노바이러스는 혈청형에 따라 병원성이 다양하게 나타나는데, 일반적으로 심낭수종 및 봉입체성 간염을 유발하는 4형이 가장 병원성이 높다. 이외의 혈청형은 조직학적으로 간에 봉입체를 형성하여 봉입체성 간염이라고도 불리우며 병원성은 4형에 비해 낮다. 단독 감염 시 폐사율은 10% 전후로 낮은 편이지만 감보로병이나 닭 전염성 빈혈 등 면역 억제성 질병과 복합 감염되었을 시 폐사율은 더 높아진다.
- 수평 및 수직 전파가 가능한 가금 아데노바이러스는 주령이 높아질수록 병원성이 감소하는 경향을 보이지만 수직 전파가 되었을 경우 병원성이 낮은 혈청형이라도 병아리에서 높은 폐사율을 유발하기 때문에, 예방을 위해서 종계에 백신을 접종하여 모체이행항체로 난계대 및 야외주 감염으로부터 방어를 하는 전략이 사용되어야 한다.

나. 국내 발생 현황

- 최근 기재된 논문에 의하면 2013년부터 2019년까지 국내에서 발생한 봉입체성 간염은 종합적으로 혈청형 4형이 63%로 가장 높은 비율을 차지했으며 그 다음으로 8b형(24%), 11형(12.3%) 그

리고 1형(0.7%) 순으로 발생하였다. 4형의 경우 병원성이 높아서 모든 품종 그리고 다양한 주령에서 발생하였지만 상대적으로 병원성이 낮은 8b형과 11형은 주로 2~3주령의 육계에서 발생하였



다.

다. 백신 개발의 필요성

- 국내에서는 가금 아데노바이러스 야외감염으로부터 방어하기 위해 4형 단일 사독백신이 2015년 출시되었고, 2023년 4형/8b형 혼합 백신이 출시되었다.
- 국내 발생 현황을 보면 2015년 4형 단일 사독백신 출시 후 4형 발생보고가 급격히 감소된 것을 확인할 수 있다. 반면에, 8b형과 11형 발생은 꾸준히 증가되면서 농가에 경제적 피해를 주는 것이 확인되었다.
- 따라서 국내에서 유행하는 대부분의 가금 아데노바이러스인 4형, 8b형, 11형을 모두 방어할 수 있는 백신의 개발이 필요한 상황이다.

○ 2-1세부

세부과제번호	제 2-1 세부과제					
세부 연구과제명	국문	가금 주요감염병 특성조사 및 진단법개발				
	영문	Development of diagnostic methods and molecular characterization for major poultry infectious diseases				
세부 연구책임자	한글성명	장형관	영문성명	Hyung-Kwan, Jang	과학기술인 등록번호	1010 3834
	소속기관	전북대학교	부서명 (학과명)	수의학과	직위	교수
	전화번호		팩스번호		E-mail	
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)					
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	합계
	정부출연금	200,000	200,000	200,000	200,000	800,000
	기업부담금					0
	기타	70,000	70,000	70,000	70,000	280,000
	합계	270,000	270,000	270,000	270,000	1,080,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급		선임급		원급이하	
	7		0		10	
						합계
						17

- 고병원성 조류인플루엔자(HPAI)의 지속적인 위협과 가금의 생산성질병의 꾸준한 발생으로 경제적·사회적 비용이 큼. 기존 닭에서 발생하던 질병뿐만 아니라 오리, 거위, 메추리 등 축종에 따라 질병이 다양화되고 있으며, 야생오리-집오리-닭으로 연결되는 순환감염 고리를 통한 병원체의 공유로 전파 위험요인의 복잡성이 커짐. 동일한 질병 발생 시에 축종별 특징에 따라 임상증상, 발생양상 및 진행양상이 크게 상이함에도 불구하고 획일적인 질병관리 및 방역체계를 적용하여 많은 문제점이 야기 됨
- 닭을 제외한 대부분 가금(오리, 칠면조, 거위, 메추리, 관상조 등) 및 야생조류의 질병 실태조사는 매우 미흡한 실정임. 또한 효율적인 질병 실태조사 및 신속진단을 위해서는 발현증상에 초점을 둔 다중 병원체 동시진단법 개발이 요구됨

○ 2-2세부

세부과제번호	제 2-2 세부과제					
세부 연구과제명	국문	국가재난형 가축질병 모니터링 진단법 개선 및 차단방역 관리 시스템 개발				
	영문	Development of monitoring methods and control system for national disaster-type animal diseases				
세부 연구책임자	한글성명	조호성	영문성명	Cho, Ho-Seong	과학기술인 등록번호	1006 0151
	소속기관	전북대학교	부서명 (학과명)	수의학과	직위	교수
	전화번호		팩스번호		E-mail	
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)					
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	합계
	정부출연금	150,000	150,000	150,000	150,000	600,000
	기업부담금					
	기타					
	합계	150,000	150,000	150,000	150,000	600,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급		선임급		원급이하	
	7		0		8	
						합계
						15

- 국내에서는 아프리카돼지열병(ASF), 구제역(FMD), 고병원 조류인플루엔자와 같은 국가재난형동물감염병은 양돈, 축우, 양계 농가 뿐 아니라 관련 산업에 타격을 줌으로써 국가의 경제적 손실을 주는 질병으로 질병의 제어를 위해서는 효과적인 모니터링 시스템의 구축, 조기 진단 시스템의 개발 및

- 차단방역 시스템 적용 등이 필수적인 요소임
- 최근에는 사람의 COVID-19가 동물에 감염되어 문제가 되고 있는 상황이어서 이에 대한 감염 모니터링 및 동물에서의 병리기전 연구 등도 수행되어야 함
 - 본 연구에서는 돼지를 중심으로 국가 재난형 가축 전염병인 아프리카돼지열병, 구제역 등의 질병에 대한 효과적인 모니터링 시스템 개선을 통해 국가 차단방역 시스템을 구축하고 이를 운용할 수 있는 전문 인력을 양성하고자 함
 - 이를 위해 현재 ASF 모니터링을 위한 구강액 검사 시스템의 개발과 현장 적용 연구를 수행하여 국내 양돈장에서 ASF를 효과적으로 모니터링하는 방법을 구축하고 있음
 - 또한 국가재난형 가축전염병 차단방역 매뉴얼의 효율성 개선 연구와 국가재난형 가축전염병 관리를 위한 농장 및 지역 위험도 평가 시스템 개발 및 활용 연구를 수행을 통해 국가재난형 동물감염병 방역의 효율성을 높이는 방향으로 연구를 진행함

○ 2-3세부

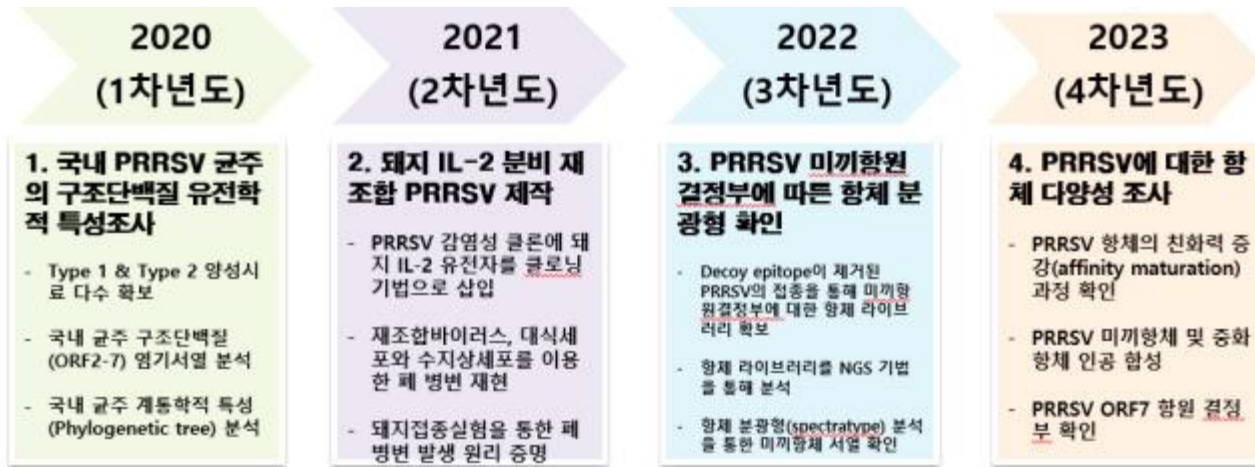
세부과제번호	제 2-3 세부과제					
세부 연구과제명	국문	국가재난형 진드기 매개질병 감염 방제를 위한 진드기 백신 항원 개발				
	영문	Development of tick vaccine antigens for the control of national disaster-type tick-borne diseases				
세부 연구책임자	한글성명	유명조	영문성명	Myung-Jo YOU	과학기술인 등록번호	10112270
	소속기관	전북대학교	부서명 (학과명)	수의학과	직위	교수
	전화번호		팩스번호		E-mail	
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)					
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	합계
	정부출연금	150,000	150,000	150,000	150,000	600,000
	기업부담금					
	기타					
	합계	150,000	150,000	150,000	150,000	600,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급		선임급		원급이하	
	7		0		7	
					합계	
					14	

- 우리나라에서 주로 분포하고 있는 진드기로 알려진 작은소참진드기 *Haemaphysalis longicornis*는 Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome(SFTS), *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma*

- bovis*, *A. phagocytophilum*, *Coxiella burnetii* 및 Spotted fever group *rickettsiae*와 같이 인수공통 및 의학적-수의학적으로 중요한 많은 질병을 매개하는 중요 매개체의 하나로 알려져 있음
- 여러 병원체의 매개에 따른 간접적인 피해는 우리나라를 포함한 전 세계적으로 산업경제에 미치는 경제적인 피해액은 매년 20억 달러 이상에 달할 정도로 계산되고 있음
 - 많은 동물 매개 병원균 매개 외에, 흡혈을 통하여 호스트(사람, 동물)에 직접적인 손상을 야기함
 - 위의 진드기 종은 크게 중국, 한국, 일본, 뉴질랜드, 호주 등 동아시아 국가에 분포
 - 본 연구의 필요성은 *Haemaphysalis longicornis*에 의한 진드기 매개 병원체의 역제를 위한 백신 후보 항원을 개발하여 진드기 백신의 후보로 할 수 있는 물질을 찾아서 백신을 만드는 기초연구를 하는 것임
 - 국내외 연구동향으로는 오스트레일리아에서는 Tick Guard라는 상업적 진드기 백신이 선을 보여 각광을 받고 있음. 그 외에도 많은 백신들이 개발되었으나 특정 생활사 단계에만 효과를 보여, 모든 생활사 단계에 효과를 지니는 새로운 백신 target의 발견이 필요함.
 - 본 연구에서 진드기 백신을 위한 유전자 검색 및 방어항원 개발에 대한 연구는 소와 같은 경제적 동물을 대상으로 활발히 진행되고 있는 실정임. 따라서 살충제를 대신할 수 있는 안전성, 유효성, 경제성이 있는 새로운 진드기 방제기술의 개발은 세계적으로 많은 투자를 하고 있는 분야임
 - 현재 세계적으로 선진국을 중심으로 환경 친화적인 진드기 방제대책에 대한 연구를 통하여 살충제의 남용에 따른 문제를 해결하기 위하여 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있음

○ 3-1세부

세부과제번호		제 3-1 세부과제							
세부 연구과제명	국문	국내 돼지생식기호흡기증후군 바이러스의 유전학적 및 면역학적 특성 분석							
	영문	Genetic and immunological analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea							
세부 연구책임자	한글성명	류영수	영문성명	Young-Soo Lyoo	과학기술인 등록번호	1010 5422			
	소속기관	건국대학교	부서명 (학과명)	수의과대학	직위	교수			
	전화번호		팩스번호		E-mail				
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)								
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	6차년도	7차	합계
	정부출연금	200,000	200,000	200,000	200,000				800,000
	기업부담금	170,000	170,000	170,000	170,000				680,000
	기타	150,000	150,000	150,000	150,000				600,000
	합계	520,000	520,000	520,000	520,000				2,080,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급	선임급			원급이하			합계	
	3	1			10			14	



○ 3-2세부

세부과제번호	제 3-2 세부과제								
세부 연구과제명	국문	가금 호흡기 병원체 진단 및 분자역학 분석법 개발							
	영문	Development of Molecular epidemiological and diagnostic tools for Avian Respiratory Pathogens							
세부 연구책임자	한글성명	이상원	영문성명	Sang-Won Lee	과학기술인 등록번호	1084 4669			
	소속기관	건국대학교	부서명 (학과명)	수의과대학	직위	부교수			
	전화번호		팩스번호		E-mail				
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)								
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	6차년도	7차년도	합계
	정부출연금	150,000	150,000	150,000	150,000				600,000
	기업부담금								
	기타								
	합계	150,000	150,000	150,000	150,000				600,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급	선임급		원급이하			합계		
	2	0		8			10		

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차년도 (2020)	가금 호흡기 병원체 진단 및 분자역학 분석법 개발 (3-2세부 건국대 이상원)	가금 세균성 호흡기계 감염병 원인체 특성조사 및 분리주 유전자원 확보	1. 가금티푸스 의심 검체 유래 살모넬라 균주 순수 분리	1. <i>Salmonella</i> Gallinarum 순수 야외분리주 7종 및 백신주 1종 균주 자원 확보
2차년도 (2021)			2. 96 well microdilution법을 이용한 살모넬라 균주의 항생제 감수성 검사	2. 국내 야외 <i>Salmonella</i> Gallinarum 분리주의 Minimal inhibitory concentration(MIC)를 포함한 항생제 감수성 데이터 확보
			3. Magnetic bead DNA extraction기법을 통한 <i>Salmonella</i> Gallinarum의 DNA 추출 및 NGS library 전처리	3-4. 연구결과 - 백신주를 포함한 총 8개의 <i>Salmonella</i> Gallinarum 균주 전장 유전체 확보 - <i>Salmonella</i> Gallinarum 9R 백신주 감별진단 primer 제작
			4. 2세대와 3세대 NGS hybrid 기법을 이용한 전장 유전체 조립 및 분석	
			1. 가금 세균성 호흡기계 감염병 의심 검체 유래 <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS)/ <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG) 순수 분리	1. MS 순수 야외분리주 4종 및 백신주 2종 균주 자원 확보
			2. 96 well microdilution법을 이용한 MS/MG 균주의 항생제 감수성 검사	2. 국내 야외 MS 분리주의 MIC를 포함한 항생제 감수성 데이터 확보
				3. 야외 분리주 4종과 백신주 2종에 대한 전장 유전체 확보

			3. MS/MG의 분포조사 및 유전자원 확보 4. MS/MG의 항생제 내성 유전자 진단 후보군 확보	4. MS의 항생제 내성 유전자 진단 후보군 확보
3차 년도 (2022)			1. Oxytetracycline과 Tiamulin에 내성을 갖는 MS 제작 2. Oxytetracycline 내성 MS와 Tiamulin 내성 MS의 유전자형 분석 3. Oxytetracycline과 Tiamulin의 내성 진단용 PCR 개발 및 적용	1. 계대배양을 통해 Oxytetracycline에 내성을 갖는 MS 제작 2. Oxytetracycline 내성 MS에 대한 전장 유전체 확보 3. Oxytetracycline 내성 유전자 진단 후보군 확보 및 내성 진단용 primer 제작
4차 년도 (2023)			1. 유통되는 닭 도체에서 살모넬라 균주 순수 분리 2. 닭 도체에서의 살모넬라 분포조사 및 96 well microdilution법을 이용한 항생제 감수성 검사 3. 항생제 내성 분포 조사 및 항생제 다제내성 살모넬라의 유전자원 확보	1. 닭 도체 유래 살모넬라 38균주 확보 2. 확보한 닭 도체 유래 살모넬라 38균주의 MIC를 포함한 항생제 감수성 데이터 확보 3. 항생제 다제내성 살모넬라 33균주 확보 및 유전형질 데이터 확보

○ 3-3세부

세부과제번호	제 3-3 세부과제								
세부 연구과제명	국문	인수공통전염병의 분자생물학적 진단 및 역학 연구							
	영문	Molecular biological diagnosis and epidemiology of zoonotic disease							
세부 연구책임자	한글성명	최인수	영문성명	Choi In-Soo	과학기술인 등록번호	1010 7074			
	소속기관	건국대학교	부서명 (학과명)	수의과대학	직위	교수			
	전화번호		팩스번호		E-mail				
연구기간	2020년 1월 31일 부터 ~ 2024년 1월 30일 까지 (4년)								
신청 연구개발비 (단위:천원)	구분	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	6차년도	7차년 도	합계
	정부출연금	150,000	150,000	150,000	150,000				600,000
	기업부담금								
	기타								
	합계	150,000	150,000	150,000	150,000				600,000
참여연구인력 (단위:명)	책임급		선임급		원급이하			합계	
	2		0		6			8	

- E형 간염 바이러스는 급성 및 만성 간염을 일으키는 원인체로 전 세계적으로 문제가 되고 있는 인수공통전염병 병원체 중 하나임. 또한 노로 바이러스는 급성 장염 및 구토를 일으키는 원인체로, 오염된 식수 및 음식의 섭취를 통해 전파되는 인수공통전염병을 유발하는 병원체임.

- E형 간염 바이러스의 증상으로는 황달, 복통, 메스꺼움, 유산 등이 있음. 특히 특정지역의 E형 간염 환자 중 임신부의 사망 비율은 현저히 높아 약 20% 이상으로 알려져 있음. 과거에는 E형 간염은 개발도상국에서 발생하는 후진국형 질병으로 인식되었으나, 현재는 선진국을 포함한 전 세계적으로 발생하는 질병으로 인식됨.
- HEV 감염률을 간접적으로 알려주는 anti-HEV seroprevalnce를 살펴보면 우리나라 국민의 HEV 감염률은 약 15-30%로 파악됨. 또한 전 세계적으로 E형 간염의 발병으로 인해 사망하는 사망자 발생률은 약 2%로 B형 및 C형 간염에 의한 사망자 비율보다 높은 것으로 알려짐.
- 노로 바이러스의 주요 증상으로는 설사, 구토, 메스꺼움, 두통 등이 있으며, fecal-oral-route를 통해 사람과 사람 사이에 전파가 가능하고, 노로 바이러스에 오염된 음식이나 식수의 섭취로 전염이 될 수 있음.
- 우리나라에서 2005년 처음 노로 바이러스 감염 발생한 이래로 매년 2000-3000명의 감염자가 확인됨. 또한 선진국에서 매년 90만 명의 환자가 발생되며 개발도상국에서는 20만명 이상의 사상자가 발생하여 전 세계적으로 주요 공중보건학적 문제로 인식되고 있음.
- 현재 국내에서 병원에 내원하는 환자로부터 확보한 샘플을 이용하여 혈청학적 및 유전학적인 데이터를 생성하고 있으나, 노로 바이러스와 E형 간염바이러스의 감염원의 surveillance study를 통한 유전체 확보 및 국내 분리주의 분자면역학적 특성 연구와 역학적 연구가 필요한 실정임.
- 따라서 공중 보건학적으로 중요한 E형 간염바이러스 및 노로 바이러스의 감염원으로부터 국내 분리주 유전체 확보, 진단법 개발, 분자면역학적 특성 연구, 역학적 연구가 필요함.
- E형 간염바이러스와 노로 바이러스의 주된 전염원인 돼지로부터 얻은 분변에서 중합효소 연쇄 반응을 통해 바이러스 유전체 검출 비율을 확인하고 그 유전체를 확보하고자 함. 확보된 유전체를 이용하여 염기서열을 분석함으로써 분자생물학적 및 역학적 조사를 하고자함. 그 결과를 바탕으로 현장에서 사용할 수 있는 신속진단간이키트를 개발함으로써, 최종적으로 동물 유래 인수 공통전염병 원인체의 유전학적, 역학적 데이터를 확보하고 그를 통해 진단키트를 개발하여 확보된 데이터의 활용이 최종 목표임.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

○ 충북대학교

1. 공동 및 특성화 커리큘럼 운영 현황
 - 주관(충북대) 및 컨소시엄 대학(전북대, 건국대)간 교육과정 개발
 - 2020. 5. 21 : 수의방역대학원 제 1차 운영위원회
 - 수의방역대학원 교육과정 설계 및 교과목 개발
 - 2020. 7. 23 : 제 2차 교육연구개발위원회 개최
 - 교육과정 설계 방향에 따른 교과목 개발
 - 2021. 3. 2 : 연구과제 I, 돼지감염병학총론, 가금감염병학총론, 수의방역기초학 개설
 - 돼지감염병학총론, 가금감염병학총론: 전북대와 공동 운영
 - 수의방역기초학: 전북대, 건국대와 공동 운영
 - 2021. 9. 1 : 연구과제 II, 수의방역정책총론, 감염병백신총론, 감염병분자면역학총론 개설
 - 수의방역정책총론, 감염병백신총론, 감염병분자면역학총론: 전북대, 건국대와 공동 운영
 - 2022. 3. 2 : 연구과제 I, 수의방역기초학, 돼지감염병학특론, 가금감염병학특론, 연구과제 III, 연구윤리 및 논문작성법 개설
 - 수의방역기초학, 돼지감염병학특론, 가금감염병학특론: 전북대와 공동 운영

- 2022. 9. 1 : 연구과제Ⅱ, 연구과제Ⅳ, 감염병백신티론, 동물감염병 방역학 총론 개설
→ 감염병백신티론, 동물감염병방역학총론: 전북대와 공동 운영
- 2023. 3. 2 : 연구과제Ⅰ,수의방역기초학, 돼지감염병학총론, 연구과제Ⅲ, 동물감염병역학총론,
연구윤리 및 논문작성법, 연구과제Ⅴ, 가금생산 및 방역총론
→ 수의방역기초학, 돼지감염병학총론, 동물감염병역학총론, 가금생산 및 방역총론: 전북대와 공동 운영
- 2023. 9. 1 : 연구과제Ⅱ, 연구과제Ⅳ, 감염병백신티론, 수의방역정책특론 개설
→ 감염병백신티론, 수의방역정책특론: 전북대와 공동 운영

과정	주요분야	소분야	교과목	학점	교육내용
기초공통과정 22학점	방역정책	방역대책, 법령, 제도개선 등	수의방역정책 총론	2	국제기구 규정, 검역, 가축전염병, 지자체 방역
			주요감염병	축우 감염병학 총론	2
	돼지 감염병학 총론	2		돼지 세균성, 바이러스성 주요 감염병 국내외 현황 소개	
	가금 감염병학 총론	2		가금 세균성, 바이러스성 주요 감염병 국내외 현황 소개	
	기초임상	소, 돼지, 가금의 기초 임상 진단	산업동물 기초수의학 (비수의학 전공자를 위한 강좌)	2	소, 돼지, 가금의 해부학 및 발생학 등
			수의방역기초학	2	서울대 평창캠퍼스, 전북대 수의대 가금 부검, 돼지 부검, 산업동물 현장 질병진단, 보정, 현장치료 등
		각 대학별 특화 실습 중점 과목 현장실습 내용구성	산업동물 임상진단학	2	열화상진단, 대동물영상진단의학 (감염병 중점), 임상진단의학 등
	진단 및 역학	감염병 최신진단기술, 분자역학 등	감염병 백신 총론	2	중양백신 전문가 활용 팀티칭 백신 기초, 개발, 활용 등
			감염병 분자진단학 총론	2	감염병 조직병리학 국내외 수준 및 최신 진단기법 소개
			감염병 분자면역학 총론	2	주요 산업동물 분자면역학 및 최신 진단기법 소개
			동물감염병 역학 총론	2	동물감염병 역학 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론티강좌(원격강의 포함)
			기초공통과정 총 학점	22	
핵심기술심화과정 32학점	산업체(농장) 생산성 및 차단 방역예찰분야	축종별 축산농가 생산성 향상 및 농장방역, 방역감시 등	동물감염병 방역학 총론	2	현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론티강좌(원격강의 포함)
			동물감염병 방역학 특론	2	현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론티강좌(원격강의 포함)
			축우 감염병학 특론	2	축우 세균성, 바이러스성 주요 감염병 사례별 토론티
			돼지 감염병학 특론	2	돼지 세균성, 바이러스성 주요 감염병 사례별 토론티
			가금 감염병학 특론	2	돼지 세균성, 바이러스성 주요 감염병 사례별 토론티
			축우 생산 및 방역 총론	2	축우 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 축우분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론티강좌(원격강의 포함)

					축우목장 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			축우 생산 및 방역 특론	2	축우 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 축우분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함) 축우목장 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			양돈 생산 및 방역 총론	2	양돈 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 양돈분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함) 양돈 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			양돈 생산 및 방역 특론	2	양돈 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 양돈분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함) 양돈 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			가금 생산 및 방역 총론	2	가금 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 축우분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함) 가금 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			가금 생산 및 방역 특론	2	가금 생산농가 생산성 향상을 위한 기본 정보(축산학과 공동) 축우분야 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함) 가금 환경관리학 포함 산업체(농장) 소독, 축사 설계 및 방 역 관리
			감염병 백신 특론	2	중양백신 전문가 활용 팀티칭 백신 기초, 개발, 활용 등
			동물감염병 역학 특론	2	동물감염병 역학 현안 중심, 이슈별 전문가 초청 토론회 강좌(원격강의 포함)
			수의방역정책 특론	2	국제기구 규정, 검역, 가축전염병, 지자체 방역
			감염병 분자진단학 특론	2	감염병 조직병리학 국내외 수준 및 최신 진단기법 소개
			감염병 분자면역학 특론	2	주요 산업동물 분자면역학 및 최신 진단기법 소개
			핵심기술과정 총 학점	32	
프로 젝트 과정	관련 기술 연구 개발	동물감염병 미래대응기 술 개발	연구윤리 및 논문작성법	2	논문졸업제 과정생 대상
			연구과제 I	2	1. 돼지 세균성소화기계 감염병 2. ICT 융합 관리시스템 개발
			연구과제 II	2	3. 가금 다가백신개발
			연구과제 III	2	4. 축우 청정화 SOP 개발
			연구과제 IV	2	5. 가금 고병원성 감염병 방역 6. 돼지 고병원성 감염병 방역 7. 진드기 백신항원 개발

12 학 점		연구과제 V	2	8. PRRS 저항성 인자 개발 9. 가금 호흡기 감염병 분자역학 10. 인수공통전염병 분자역학 11. 현장연구과제*
		프로젝트과정 총 학점	12	
			66	

기초 공통과정 30%(22학점), 핵심기술 심화과정 52%(32학점), 프로젝트 과정 18%(12학점) 구성

프로젝트 과정 연구과제 I~V는 1~10의 연구 세부과제 책임교수 또는 참여교수가 지도학생 연구과제 수행으로 운영함(11. 현장연구과제의 경우, 연구과제 I~V 이외의 연구주제로 현장 산업체 실습 및 학습으로도 운영가능함)

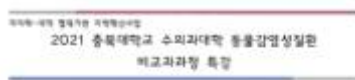
-가축방역, 병해충방제, 매개곤충학, 농장위생, 소독, 구서, 거점소독시설관리, 각종 인증(haccp,iso,무항생제 인증)상의 방역 등 교육과정 개편을 통해 좀 더 구체화 하여 전문화할 계획.

- 주교재 원서 번역 및 부교재 선정 및 출간 완료

	
<p>주교재 원서명: Biosecurity in Animal Production and Veterinary Medicine: From principles to practice</p> <p>Edited by: Jeroen Dewulf, Ghent University, Belgium, Filip Van Immerseel, Ghent University, Belgiu</p>	<p>번역서명: 수의방역의 이론 및 실제</p> <p>역자: 수의방역대학원</p> <p>출간일자: 2021년 5월 31일</p>

2. 비교과과정 운영

- 2021. 5. 8.(토) : 동물감염성질환 비교과과정 특강



2021년 5월 8일(토)
충북대학교 수의과대학



○ 1-1세부

<1차년도>

- 돼지 소화기계 감염병 시료에 대한 미생물학적 특징 조사

- 국내 양돈 약 500농가를 대상으로 소화기계 감염병 환돈의 사육단계별 (포유자돈, 이유자돈, 육성돈, 비육돈)로 분변, 소장 및 대장 시료를 채취하여, 대장균, 살모넬라 등 약 760여 균주를 분리한 후, 선택감별배지, 생화학적 검사, API 동정, 16S rRNA 분석 등을 통하여 미생물학적 특성 조사를 완료하였음.

● 주요 병원성 원인체의 항생제 감수성 및 내성인자 특성조사

- 최근 2년간 국내 설사 이유자돈에서 분리한 대장균 118균주를 대상으로 편모 부착 인자와 독소 산생 유전자를 분석한 결과, 부착인자 조합 중 가장 우세하게 검출되는 것은 F18 (48균주)이며, 뒤이어 F4가 우세하게 검출되었음 (20균주). 독소 산생 유전자의 조합 중 부종병을 유발하는 Stx2e가 25균주로 가장 우세하게 검출되었음.

<2차년도>

● 유전자 지문분석법에 의한 유전학적 상동성 분석

- MLST 기법을 이용하여 국내 우세 병원성형인 ETEC 29개 균주와 STEC 35개 균주에 대하여 유전학적 상동성을 분석하였으며, 유전학적 상동성별로 Cluster를 구분하여 분석한 결과, 각 Cluster는 특정한 항생제 내성 패턴을 나타냄을 확인함 (Cluster I: gentamicin, streptomycin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracyclines 내성 패턴 보유 / Cluster V: ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, cefoxitin, cefazolin, norfloxacin, colistin 내성 패턴 보유)

<3차년도>

● 감염병 원인체의 Multiplex PCR법 개발을 위한 프라이머 제작

- 돼지 소화기계 질병 주요 원인체 5종인 *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Lawsonia intracellularis*를 특이적으로 검출하는 Primer를 제작함.

● 국내 분리주를 이용한 유용성 및 교차반응 검사

- 국내 세균성 돼지 소화기계 감염병 원인체 분리주 및 참조균주를 대상으로 multiplex PCR 기술을 적용하여 PCR 반응을 진행한 결과, Self-dimer를 형성하지 않으면서 각 원인체에 대한 PCR band가 검출됨을 확인함.
- PCR 반응 결과, 각 원인체별 band의 size가 100 bp 이상 차이가 나타나 multiplex PCR의 유용성을 확인하였음.
(*E. coli*: 506 bp, *Salmonella* spp.: 185 bp, *C. perfringens*: 275 bp, *B. hyodysenteriae*: 379 bp 및 *L. intracellularis* 770 bp)

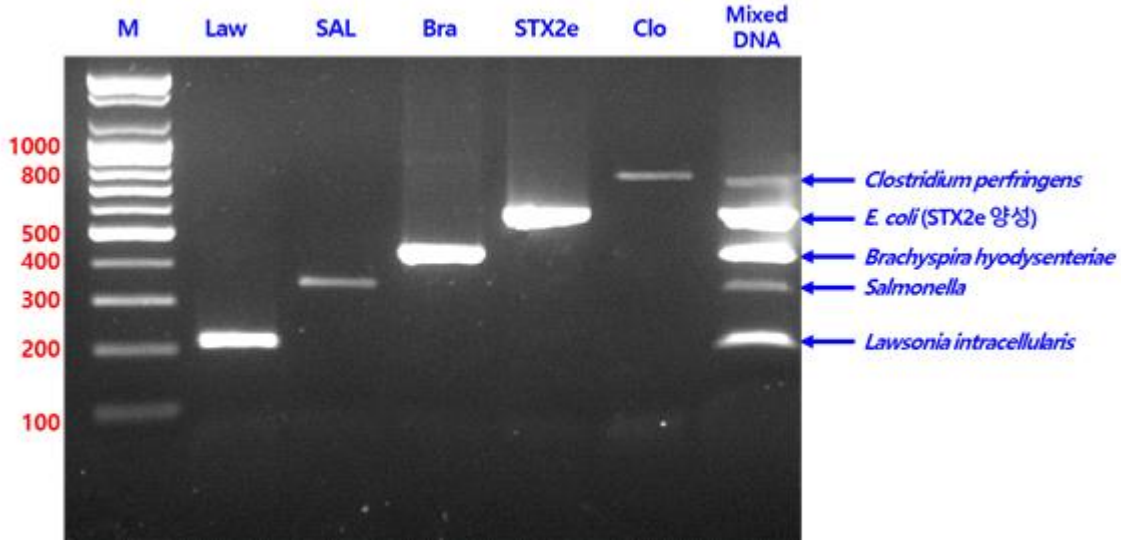
<4차년도>

● 신속진단 키트 개발 및 감염병 원인체별 검출한계값 조사

- 3차년도 연구수행 결과를 바탕으로 각 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물을 신속하게 진단, 검출할 수 있는 키트의 시제품을 제조하였음. 시제품은 신속한 진단, 검출을 위하여 DNA polymerase, PCR용 반응 buffer, dNTP Mixture를 혼합한 pre-made 제품으로, PCR 반응시 buffer, dNTP mixture 등을 따로 첨가할 필요가 없이 조작이 간편하게끔 조성하였음.

- 4차년도 연구수행 결과 개발한 키트의 감염병 원인체 진단결과의 3차년도 연구결과와의 재현성을 검증한 검사 결과, 3차년도의 연구결과와 동일하게 원인체 5종의 DNA가 간섭없이

목적하는 크기 (207, 345, 447, 598 및 777 bp)에서 증폭되었으며, 이외의 위치에서는 밴드가 나타나지 않음을 확인하였음. 이를 통하여 실제 샘플에서 여러 균주의 DNA가 혼합된 상태에서도 키트를 활용하여 각각의 특정 대상 유전자를 정확하게 증폭할 수 있음을 확인함.



신속진단 키트의 원인체별 검출한계를 확인한 결과, 키트를 이용한 각 감염병 원인체의 검출한계값은 아래 표와 같으며, 이는 미량의 시료로도 감염병 원인체를 신속하게 진단할 수 있는 기반 근거가 될 수 있음.

돼지 소화기계 주요 병원성 미생물	검출한계값
Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	32 pg
<i>Salmonella</i> spp.	1.28 pg
<i>Clostridium perfringens</i>	0.26 pg
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	< 0.26 pg
<i>Lawsonia intracellularis</i>	800 pg

● 현장진단 및 신속진단 키트의 효용성 평가

- 개발한 신속진단 키트의 현장 적용 효능을 평가하기 위하여, 국내 양돈 10개 농가를 대상으로, 수의사의 진단 하에 대장균성/살모넬라성 설사증, 장독혈증, 돈적리, 증식성 회장염 등 소화기계 감염병 환돈으로 진단된 개체의 폐사체 및 안락사 개체의 분변, 소장 및 대장 시료를 사육단계별 (포유자돈, 이유자돈, 육성돈 및 비육돈)로 채집하여 분석하였음.
- 4차년도 연구수행 결과, 분석 결과, 양돈 전문 수의사 및 병성감정전문기관의 소화기계 감염병 진단 결과와 신속진단 키트를 활용한 검사결과간 유의미한 차이가 나타나지 않았으며, 이를 통하여 개발한 신속진단 키트가 현장에서 즉시 적용이 가능함을 확인할 수 있었음.

돼지 소화기계 감염병	진단 검체 수		
	양돈전문 수의사 진단결과 (= 샘플 수)	병성감정전문기관 검사결과	신속진단키트 검사결과
대장균증(특히 부종병)	28	28	28
살모넬라 감염증	21	20	21
장독혈증	14	14	14
돈적리	2	1	2
증식성 회장염	2	2	1

○ 1-2세부

<1차년도>

1차년도 연구수행 주요내용

- 사양 관리를 기본으로 역학, 예찰, 방제가 가능하도록 지리정보를 결합한 ICT 융합 동물전염병 관리 시스템(이하 목표 시스템)의 설계를 진행하였음
- 축사 정보를 기록하고 방역 정보, 입/출 정보를 연결하여 관리하며 이후 개체를 등록하고 개체에 대한 기본 정보(성별, 연령 등), 예방접종 정보를 연동 관리하도록 구성하였음
- 축사 정보는 CCTV 정보와 연결되며 축사 내 개체의 상태를 모니터링 할 수 있도록 설계하였으며, 나아가 향후 이를 빅데이터 분석을 통해 발정, 질병 등의 예측이 가능하도록 설계하였음
- 외부 데이터 연동이 가능하도록 확장성을 고려하였으며, CCTV 외 다양한 IoT 디바이스가 부착/연동될 수 있도록 OpenAPI(Open Application Programming Interface)를 적용한 구성으로 설계하였음
- 목표 시스템은 소프트웨어 개발 방법론을 선정하고 개발 방법론에 의거하여 요구사항 분석, 사용자 인터페이스(사용자 화면) 설계, 데이터베이스 설계를 진행하였음

<2차년도>

1. 2차년도 최종목표 : 돼지번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리시스템 구축

- 돼지 생식기계 감염병 관리시스템 구축을 위한 샘플링
- 돼지 번식관리와 관련한 체외성숙시스템 개선 연구
- 감염병에 의한 돼지 번식기계 질환 분석수단 개발을 위한 줄기세포 활용 오가노이드 생산 시스템을 위한 돼지 영양막줄기세포 확립 연구
- 동물전염병 방역 전주기에 걸친 동물질병 역학조사 및 예찰정보 수집 및 활용기능 개발
- 축산시설 출입차량 정보, 방역실태 정보, 가축매몰지 정보 등 동물전염병 방역 전주기에 걸친 지리정보 수집 및 활용기반 기능 개발
- 농가별 생육환경, 축산시설 출입 차량의 GPS 좌표 등의 실시간 수집을 위한 IoT센서 데이터 활용기반 기능 개발
- 농림축산검역본부, 지역방역본부, 농협 등 외부 데이터 연동기능 개발
- 시스템 활용 현장실습 운영을 통해 파악한 축산업 종사자, 방역 실무자, 예찰 실무자, 백신 공급자 등의 현장 실무자 중심 요구를 반영하여 시스템 고도화
- 실시간 데이터 수집 및 활용 채널의 다변화를 위한 모바일 앱 개발
- 룰 기반 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델을 구축하고, 지속적인 모델 고도화를 통해, 목표시스템은 예방차원의 분석을 수행

2. 수행 과정

- 돼지 생식기계 감염병 관리시스템 구축을 위한 샘플링

- 농장으로부터 돼지 생식기계 분비물 샘플링 시스템 도입

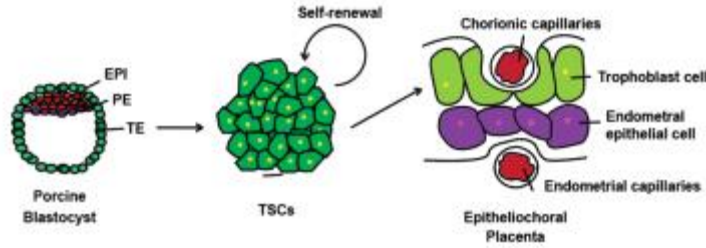
예) 전남 A농장으로부터 수컷 원정액 및 희석정액 샘플링 각 5두와 암컷 자궁 및 질 분비물 샘플링 각 10두 진행

● 돼지 번식관리와 관련한 난모세포의 체외성숙시스템 개선 연구

- 돼지 감염성질환에서 증가하는 CCL2와 NT4와 같은 사이토카인 인자들이 돼지 난모세포의 성숙 및 번식에 미치는 영향을 확인하기 위한 연구 수행

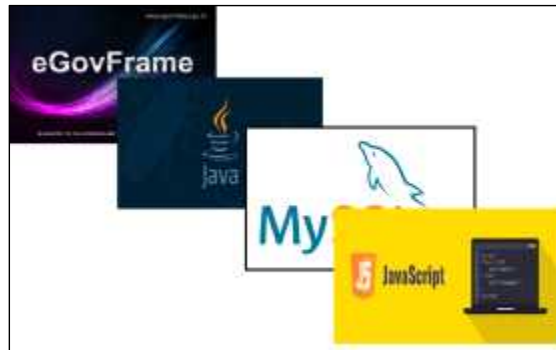
● 감염병에 의한 돼지 임신중 유산 관련 연구를 위한 영양막줄기세포 확립 및 분석

- 인수공통 감염병 원인체가 돼지 임신 중 유산시 태반에 미치는 영향을 시험관내에서 분석할 수 있는 오가노이드 시스템 개발을 위한 돼지 영양막줄기세포의 확립 및 분석연구 수행



<그림 1> 돼지 배반포로부터 영양막줄기세포의 확립 및 태반생성을 보여주는 모식도

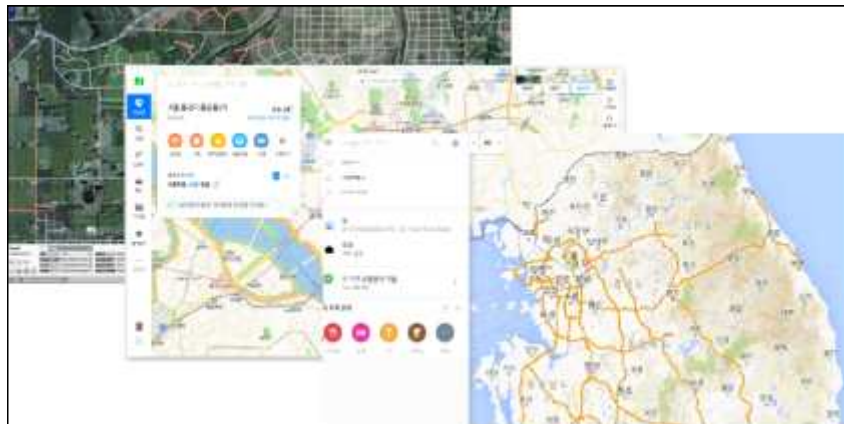
● 관리시스템 구축 전 개발언어 선정, 프레임워크 퍼포먼스 검토 및 프레임워크 세팅 작업 진행



<그림 2> 개발 언어, 프레임워크 선정

● 프레임워크에 사용할 플러그인 조사, 퍼포먼스 분석 및 프레임워크에 플러그인 적용 진행

- 시스템에 적용 될 GIS 지도(OpenStreetMap, 구글Map, 네이버Map) 등 퍼포먼스 분석 진행



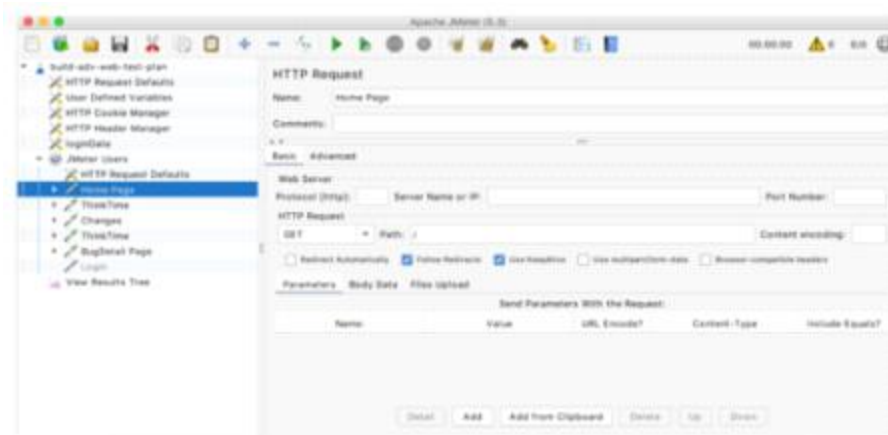
<그림 3> 지도 API 조사

- 시스템에 적용 될 Iot 제품 조사, 퍼포먼스 분석 진행



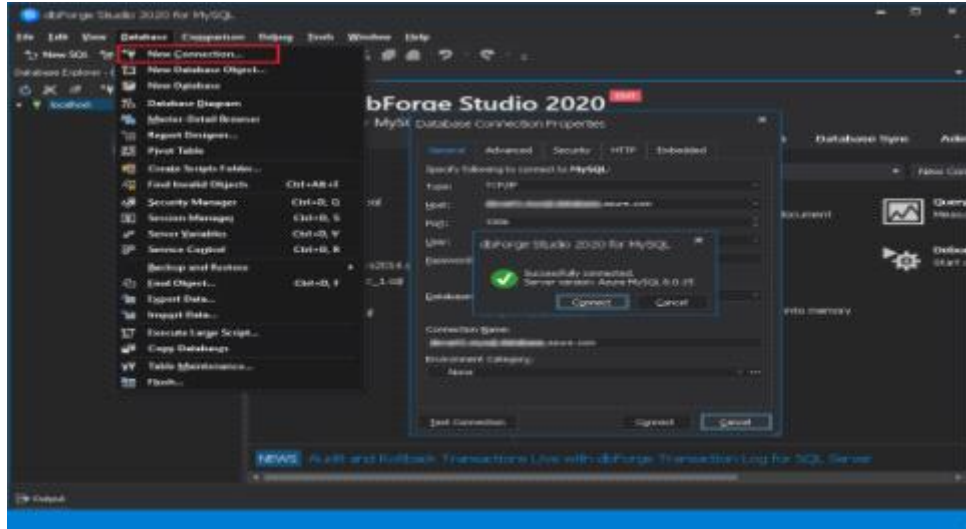
<그림 4> Iot 제품 조사 및 분석

● 데이터베이스 선정 전 퍼포먼스 분석(jmeter) 진행



<그림 5> 데이터베이스 퍼포먼스 분석

● 화면설계서를 바탕으로 데이터베이스 구축 작업 진행



<그림 6> 데이터베이스 구축

● 구축 간 단위테스트를 위한, 단위 테스트 시나리오 작성 진행

구분	테스트 항목	테스트 내용	결과	비고	
구축	시작전	데이터베이스 설치 및 초기화 완료			
		시작 전제 조건 확인			
		시작 시 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
	시작 후	시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
		시작 후 로그 출력 확인			
종료 후	종료 후 로그 출력 확인				
	종료 후 로그 출력 확인				
	종료 후 로그 출력 확인				
	종료 후 로그 출력 확인				
	종료 후 로그 출력 확인				
	종료 후 로그 출력 확인				

<그림 7> 단위테스트 시나리오

● 구축 완료 후, 통합테스트를 위한, 통합 테스트 시나리오 작성 진행

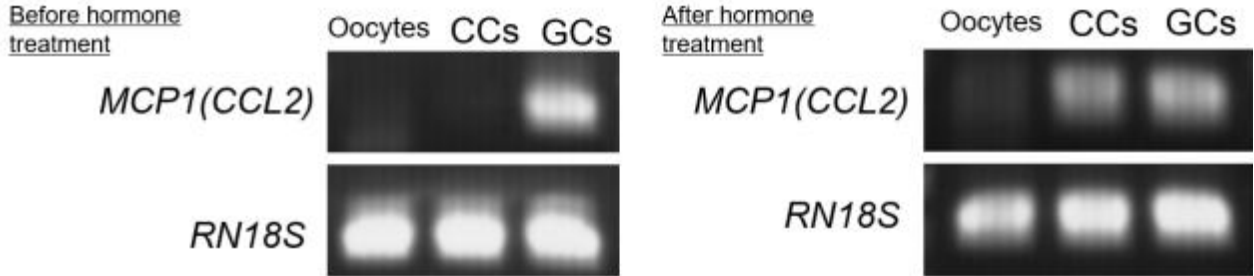
구분	TestID	테스트 목적	실행 방법	부적합 내용
구축	20-001	데이터베이스 설치 및 초기화 완료		
	20-002	시작 전제 조건 확인		
	20-003	시작 시 로그 출력 확인		
	20-004	시작 후 로그 출력 확인		
	20-005	시작 후 로그 출력 확인		
	20-006	시작 후 로그 출력 확인		
시작 후	20-007	시작 후 로그 출력 확인		
	20-008	시작 후 로그 출력 확인		
	20-009	시작 후 로그 출력 확인		
	20-010	시작 후 로그 출력 확인		
	20-011	시작 후 로그 출력 확인		
	20-012	시작 후 로그 출력 확인		
종료 후	20-013	종료 후 로그 출력 확인		
	20-014	종료 후 로그 출력 확인		
	20-015	종료 후 로그 출력 확인		
	20-016	종료 후 로그 출력 확인		
	20-017	종료 후 로그 출력 확인		
	20-018	종료 후 로그 출력 확인		

<그림 8> 통합테스트 시나리오

◎ 돼지 난모세포의 체외성숙 시스템 개선

- 사이토카인 CCL2를 돼지 난자 체외성숙 시스템에 처리하여 영향 평가

: RT-PCR기법을 통해 돼지 체외성숙 시스템에서 돼지 난모세포, 난구세포 및 과립막세포 내 CCL2 cDNA의 발현을 확인함.

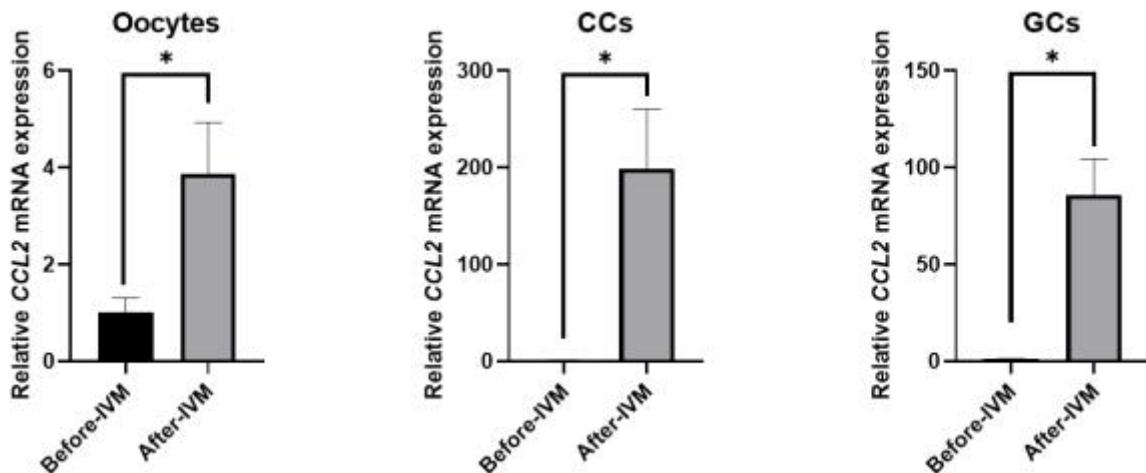


<그림 9> 돼지 체외성숙시스템에서 hCG호르몬처리 전후 돼지 난모세포와 난구세포 및 과립막세포 내 CCL2의 발현확인
 : 돼지 체외성숙 후 난모세포, 난구세포 및 과립막세포 내 CCL2 mRNA의 발현이 체외성숙 전인 각각의 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 qRT-PCR기법을 통해 확인함.

Table 1. Effect of MCP1 (CCL2) supplementation in maturation medium on nuclear maturation (supplied for the entire time of IVM).

CCL2 concentration (ng/ml)	No. of oocytes cultured for maturation*	Mean± SEM (%) oocytes at the stage of			
		Germinal vesicle	Metaphase I	Anaphase and telophase I	Metaphase II
0	158	1.8± 1.0	14.0± 1.8	2.3± 1.5	81.8± 1.8 ^a
1	158	1.4± 1.4	9.2± 3.7	1.2± 1.2	87.6± 2.1 ^{ab}
10	166	0	5.2± 3.7	2.8± 2.8	91.3± 3.4 ^{ab}
100	158	0	5.8± 3.9	1.2± 0.6	91.6± 3.6 ^b

<그림 10> 돼지 난모세포의 핵성숙에 CCL2의 처리가 미치는 영향 확인

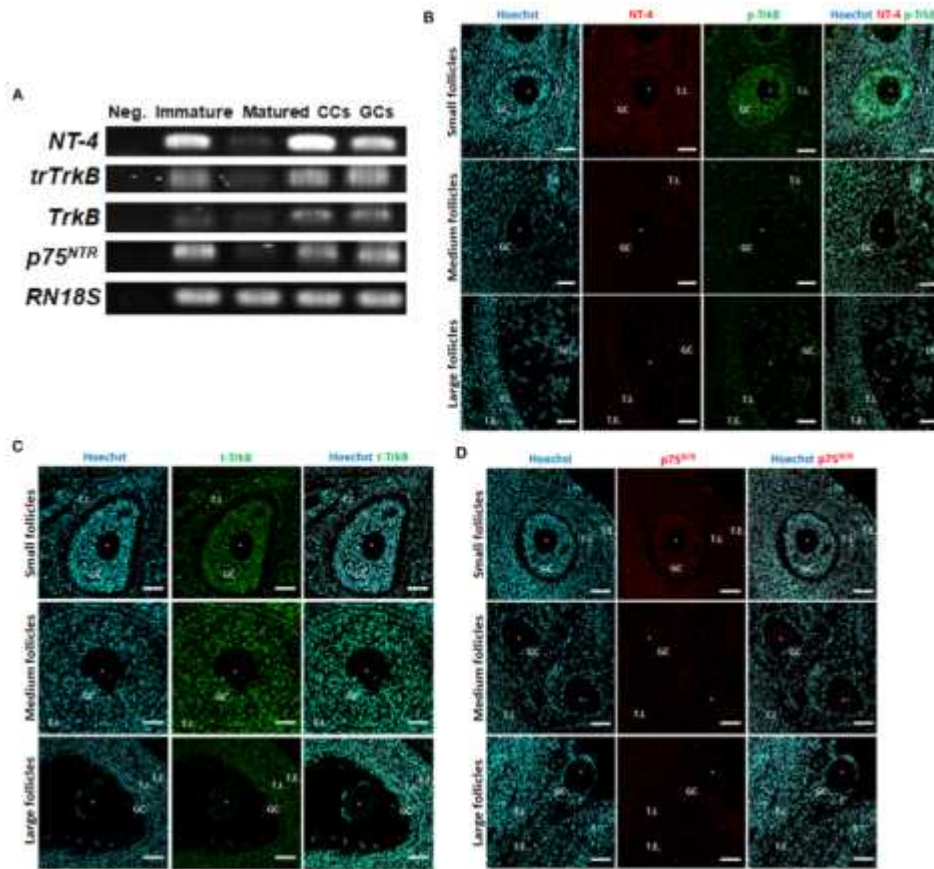


<그림 11> 돼지 체외성숙 전후 난모세포와 난구세포 및 과립막세포 내 CCL2 mRNA의 발현 분석

: 돼지 난모세포의 체외성숙과정 중에 100 ng/mL CCL2의 처리시 MII 형성율이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인함.

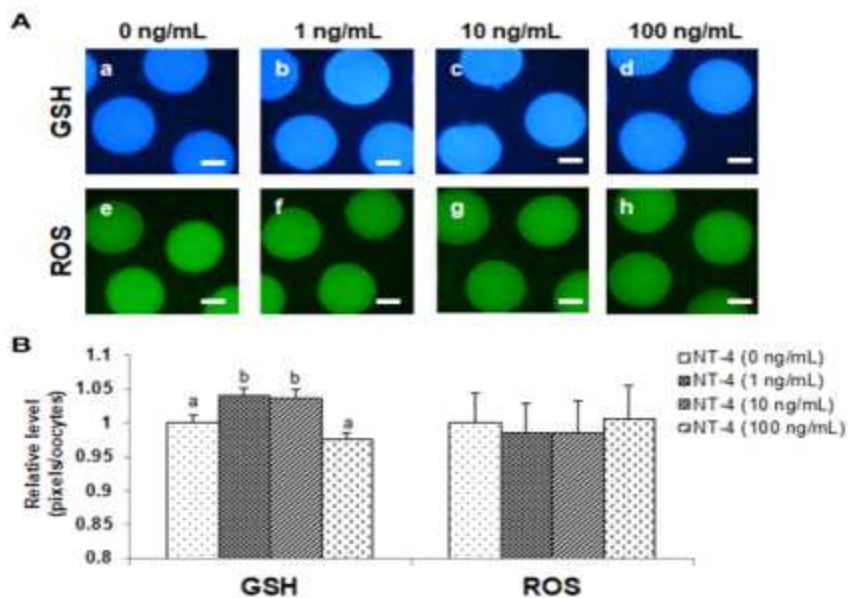
- 사이토카인 뉴트로핀4(NT4)를 돼지 난자 체외성숙 시스템에 처리하여 영향 평가

: 돼지 난소내 미성숙 및 성숙 난모세포와 난포세포에 존재하는 NT-4, trTrkB, TrkB, p75NTR의 발현을 PCR기법 및 면역형광염색기법을 통해 확인함.



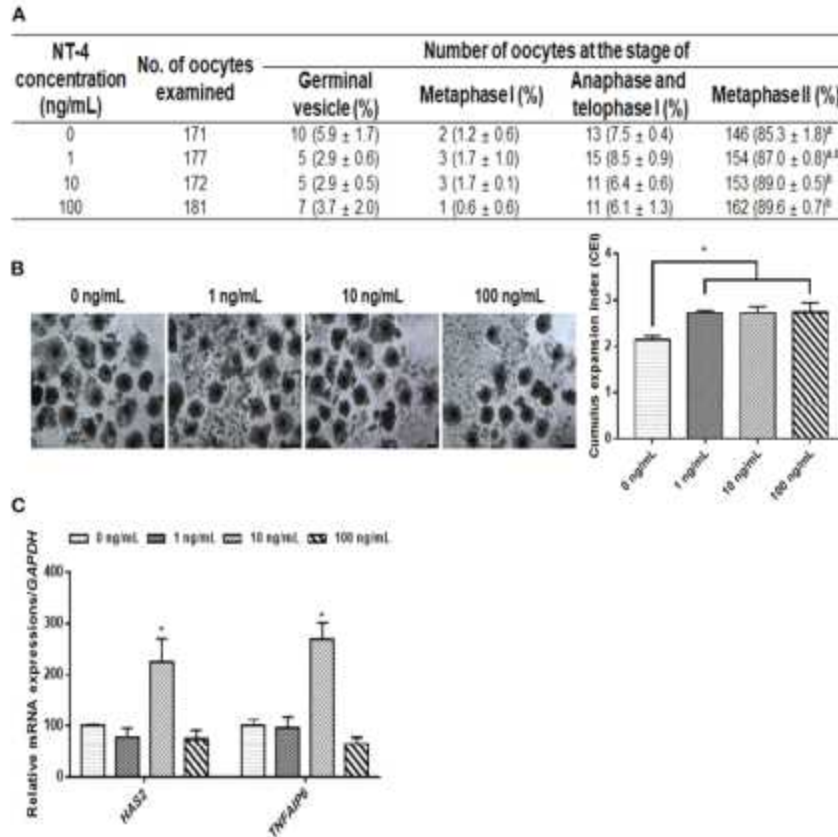
<그림 12> 돼지 난소의 난포사이즈별 난포세포내 뉴트로핀4의 발현을 PCR 및 면역형광 염색을 통해 확인

: 돼지 난모세포의 체외성숙과정 중에 1 ng/mL과 10 ng/mL의 NT-4의 처리시 글루타치온(GSH)의 발현이 유의적으로 대조군에 비해 증가하였음을 확인함.



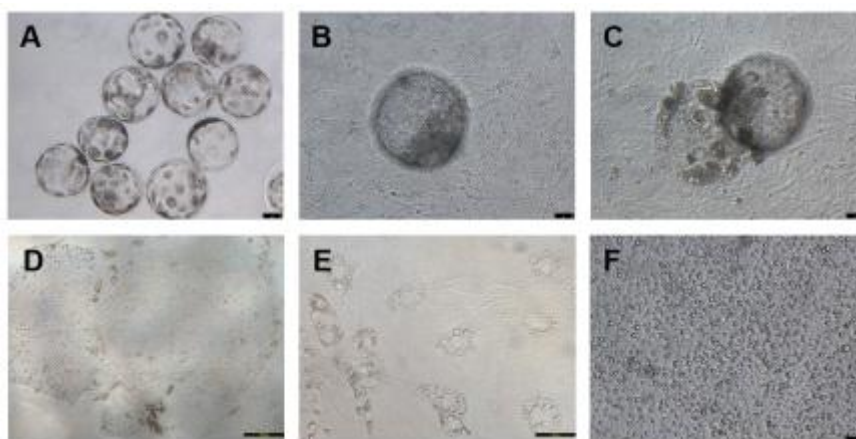
<그림 13> 돼지 난모세포의 세포질성숙에 NT4의 처리가 미치는 영향 확인

: 돼지 난모세포의 체외성숙과정 중에 10 ng/mL과 100 ng/mL의 NT-4의 처리시 MII 형성율이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였으며, 1, 10, 100 ng/mL의 NT-4의 처리는 난구세포의 확장을 유의적으로 증가시켰으며, 특히 10 ng/mL의 NT-4의 처리는 HAS2와 TNFAIP6의 발현을 유의적으로 증가시킴.



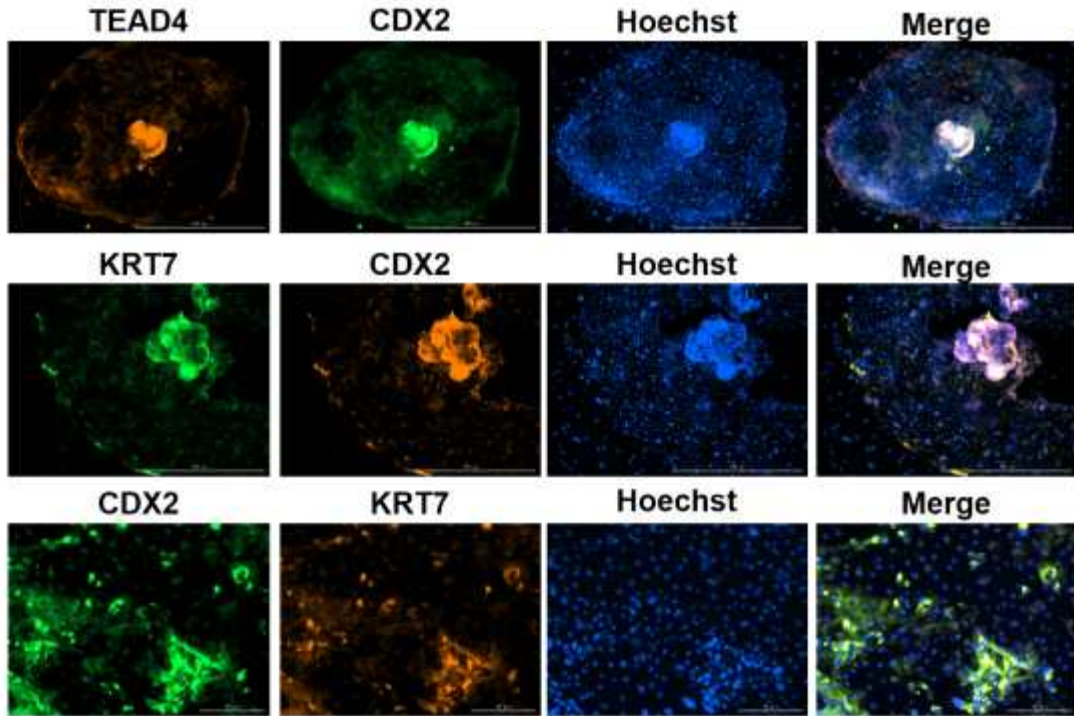
<그림 14> 돼지 난모세포의 핵성숙 및 난구세포의 확장에 NT4의 처리가 미치는 영향 확인

- 단성생식(PA)유래 배반포로부터 영양막줄기세포주 구축
 - 7일째 단성생식유래 배반포를 마우스 배아섬유아세포 (Mouse embryonic fibroblast, MEF) 위에 plating하여 primary 콜로니가 형성되어 세포주로 확보함.



<그림 15> 돼지 단성생식 유래 배반포로부터 돼지 영양막줄기세포주의 구축 과정

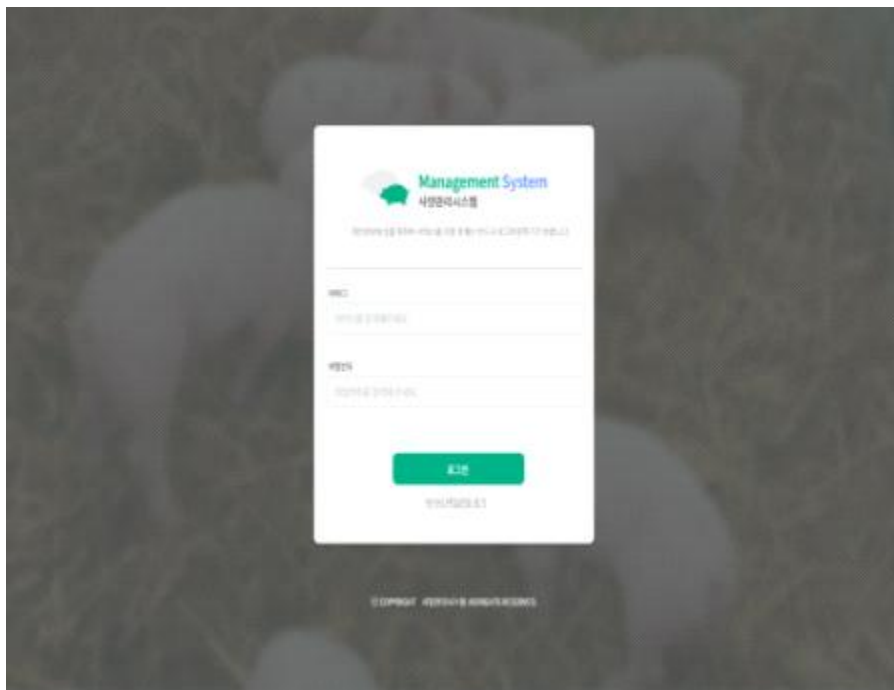
- 돼지 번식기계 영양막줄기세포주 특성분석
 - 돼지 영양막줄기세포주 특이마커인 TEAD4, CDX2 및 KRT7의 발현을 면역형광염색을 통해 확인함.



<그림 16> 돼지 영양막줄기세포주의 특이마커 발현을 면역형광 염색을 통해 확인

- 설계된 자료를 이용하여 ICT(Information and Communication Technology Pig House Management System) 돈사 관리 시스템 구축

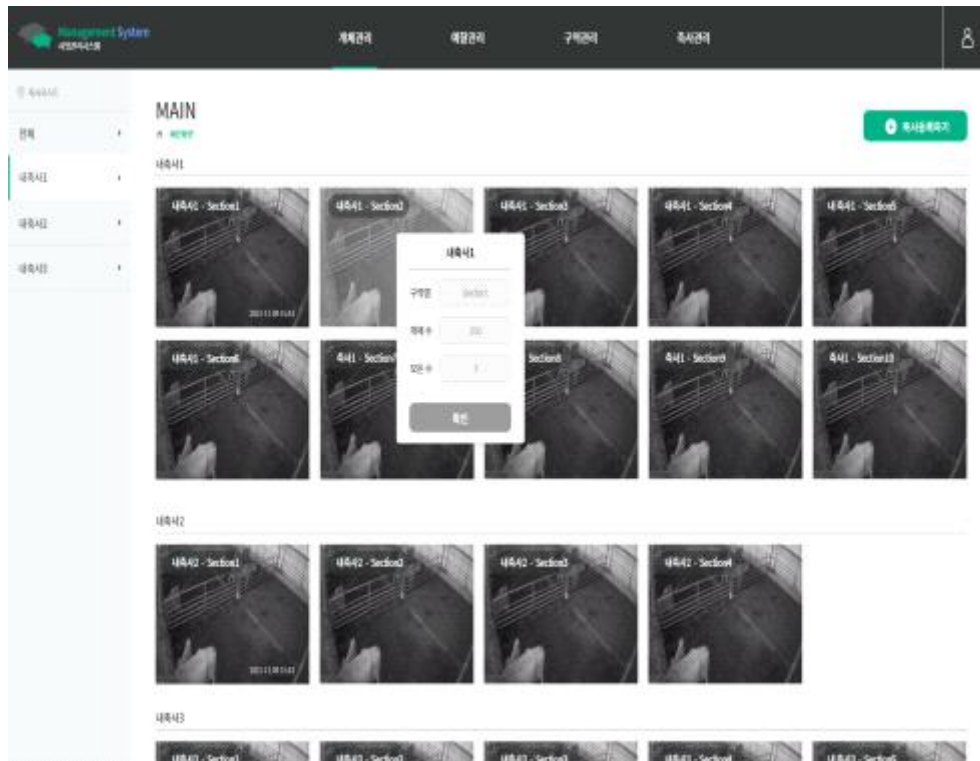
(1) 로그인/회원가입



<그림 17> 로그인 페이지

(2) 메인 페이지

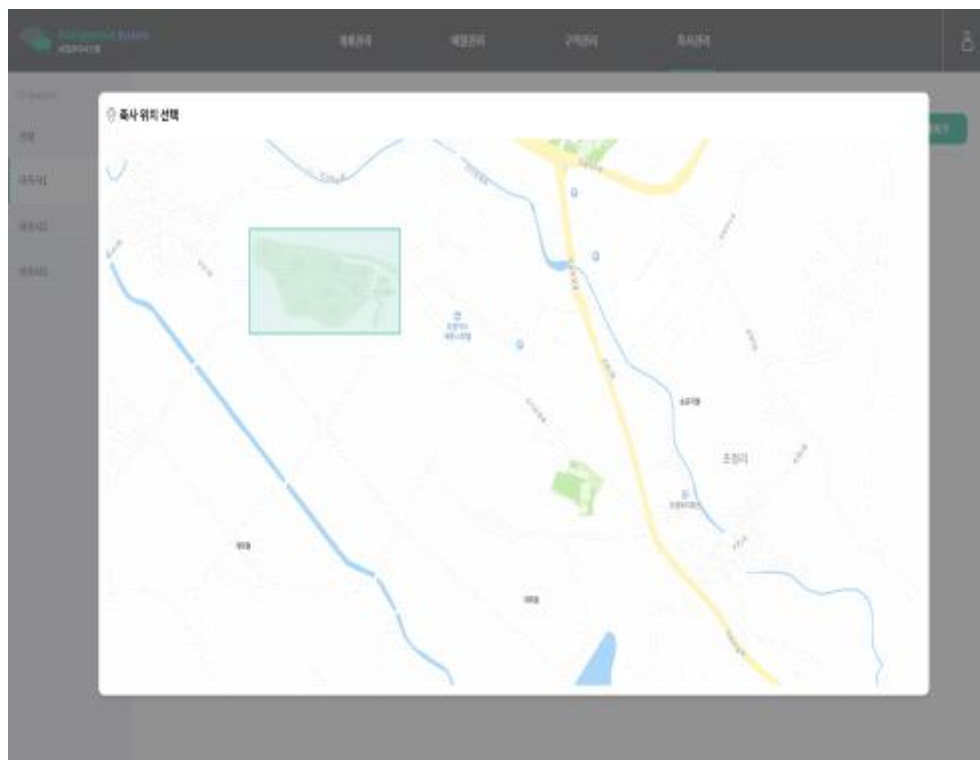
- CCTV를 활용하여 돈사별 모돈, 개체 수를 한눈에 확인 가능하도록 화면 레이아웃 구축



<그림 18> 메인 페이지

(3) 돈사 관리

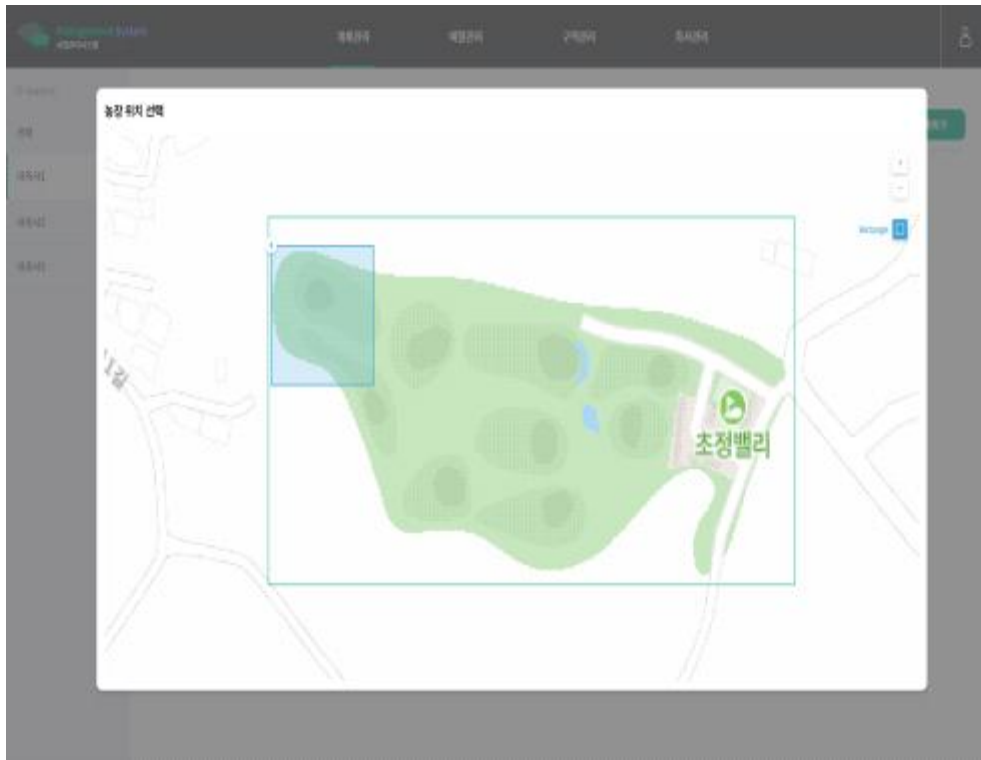
- OpenStreetMap(위치정보) 내부 API를 활용하여, 돈사의 위치를 지정할 수 있는 기능 구축.



<그림 19> 축사 관리 페이지

(4) 구역 관리

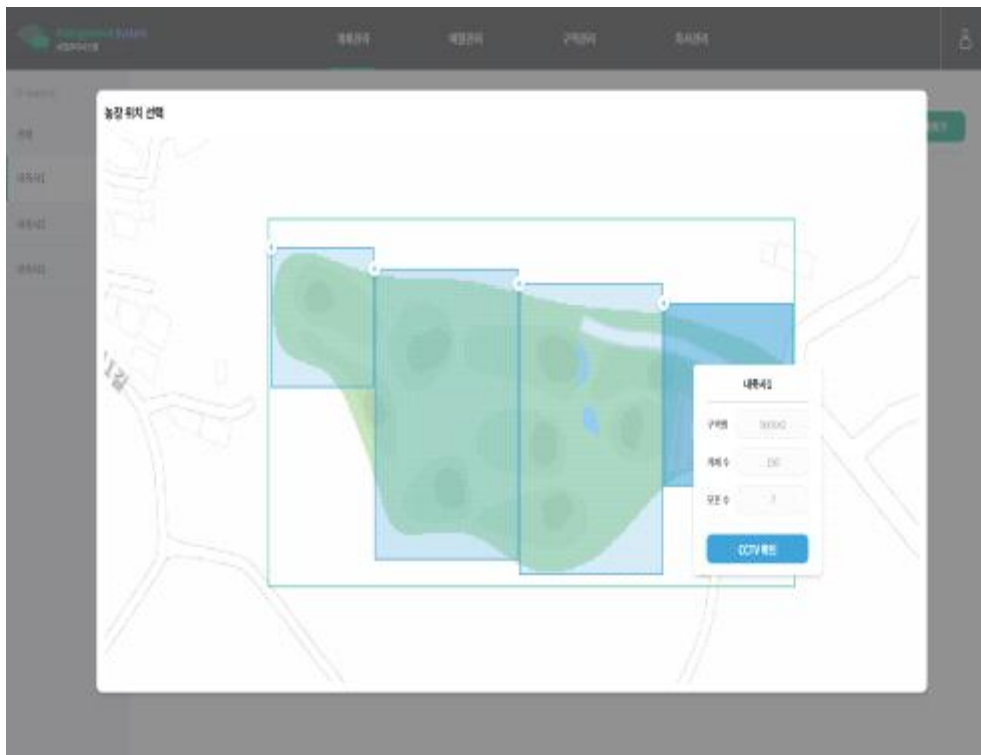
- 돈사의 위치를 지정한 후, 그 위치 안쪽에 구역을 지정할 수 있는 기능 구축.



<그림 20> 구역 관리 페이지

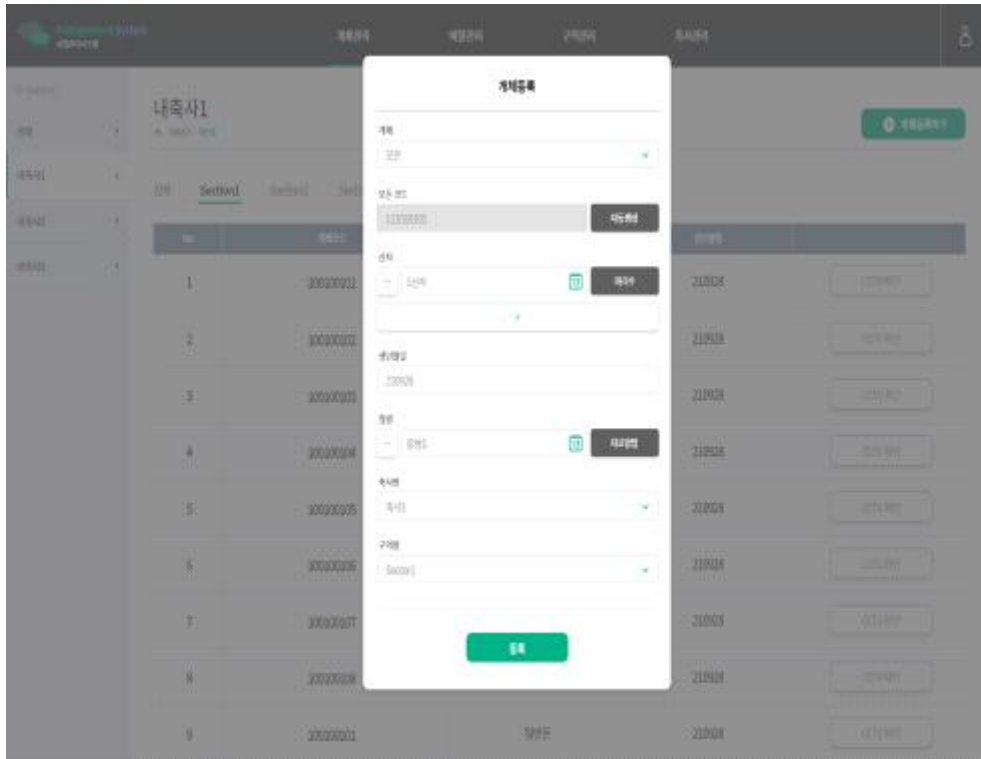
(5) 개체 관리

- 지정한 구역을 이용하여 구역 내에 개체를 조회 및 관리 할 수 있는 기능 구축.



<그림 21> 개체 관리 - 메인 페이지

- 선택한 구역에 개체(모돈, 군) 별로 개체 정보를 등록할 수 있는 기능 구축.



<그림 22> 개체관리 - 모돈/군 등록 페이지

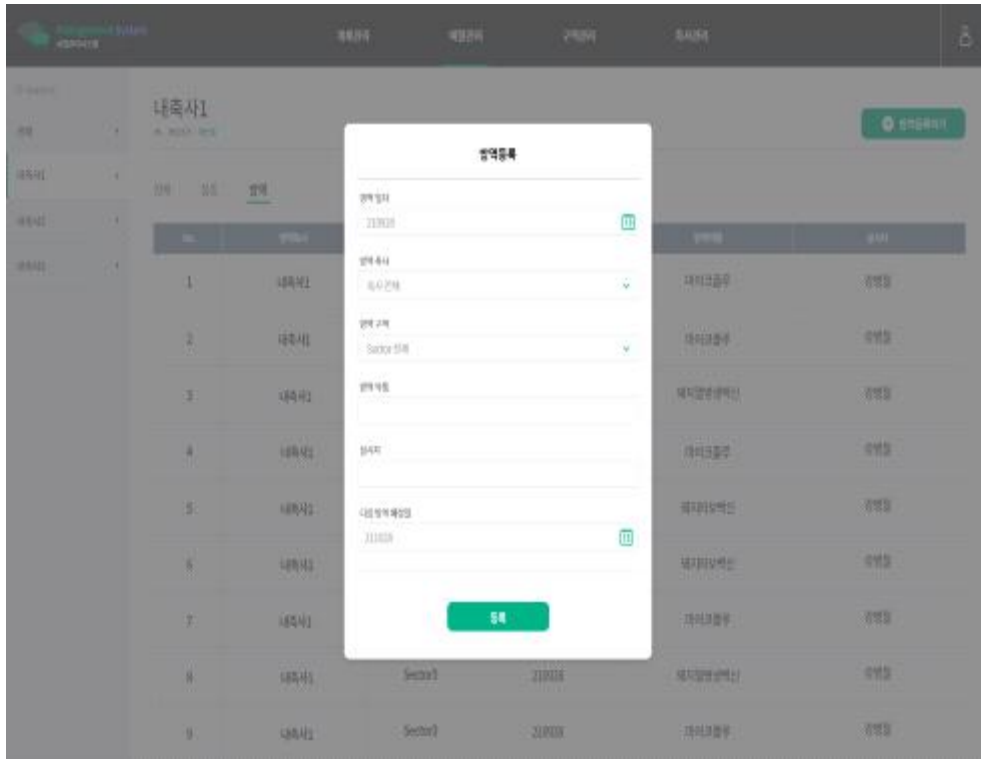
- 구역별 단일 CCTV를 통하여, 개체의 행동패턴 확인이 가능하도록 구축.



<그림 23> 개체 관리 - CCTV 페이지

(6) 예찰 관리

- 축사 내, 구역별 방역이 진행된 정보를 등록 및 관리 할 수 있는 기능 구축.



<그림 24> 예찰 관리 - 방역 등록 페이지

<3차년도>

- 돼지 번식계통 감염병 관리를 위한 병원체 핵산 추출 프로토콜 확립
 - 동물병원으로부터 샘플링한 병원체 양성 컨트롤을 활용해 체계적인 병원체 핵산 추출기법 정착
- 돼지 번식관리와 관련한 난모세포의 체외성숙시스템 개선
 - 돼지 감염성질환에서 나타날 수 있는 CCL2와 NT4와 같은 사이토카인 인자들이 돼지 난모세포의 성숙 및 번식에 미치는 분자학적 기전 분석
- 감염병에 의한 돼지 임신 중 유산과정의 시험관내 연구시스템의 기반이 되는 세포 확보
 - 인수공통 감염병 원인체로 인해 돼지 임신중 유산시 태반에 미치는 영향을 시험관내에서 분석할 수 있는 오가노이드 시스템 개발을 위해 필수적인 돼지 영양막 줄기세포의 안정적인 세포주 유지 가능여부 확인 및 단계별 특성분석 완료
- 프로그램 고도화 작업 진행
 - 현재 농가에서 관리하는 부분에 해당 프로그램을 사용하는 데 있어 필요한 사항들을 농가마다 방문하여 요구사항 수렴
 - ICT 돈사관리 시스템v1.1을 이용하여 데이터 수집 및 보관 뿐만 아니라, 농가 전체의 온도나 습도 등을 모니터링하는 IoT 센서 데이터를 추가 개발하여 기후, 발병 등의 문제 발생을 최소화하고, 전반적 돈사 관리의 편리성 증대
- 모바일 어플리케이션 개발로 인한 사용성 및 안전성 증대
 - 기존 ICT 돈사 프로그램 구축 후에 데이터 수집을 진행
 - 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 데이터 구축을 위하여 가축의 이동 경로를 GPS로 파악할 수 있는 모바일 어플리케이션을 개발하여 발병을 예측하고 파악할 수 있는 안전성 및 사용성 증대

● 룰 기반 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안 도출

- 모바일 어플리케이션 관련 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안

→ 기존 GPS로 경로를 파악하는 것에 더하여 해당 가축의 정보를 파악할 수 있는 데이터 구축

- 모바일 어플리케이션 관련 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안

→ 기존 GPS로 경로를 파악하는것에 더하여 해당 가축의 정보를 파악할 수 있는 데이터 구축

- 온/습도 및 암모니아 센서 등 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안

→ 구역마다 설치된 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 가축 생활 환경에 대한 정보를 확인할 수 있는 데이터 구축

<4차년도>

1-1. 최종목표 : 돼지 번식관리 및 ICT 융합 동물감염병 관리 시스템 현장도입

● 동물전염병 방역 전주기에 걸친 동물질병 역학조사 및 예찰정보 수집 및 활용기능 개발

● 축산시설 출입차량 정보, 방역실태 정보, 가축매몰지 정보 등 동물전염병 방역 전주기에 걸친 지리정보 수집 및 활용기반 기능 개발

● 농가별 생육환경, 축산시설 출입차량의 GPS 좌표 등의 실시간 수집을 위한 IoT센서 데이터 활용기반 기능 개발

● 농림축산검역본부, 지역방역본부, 농협 등 외부 데이터 연동기능 개발

● 시스템 활용 현장실습 운영을 통해 파악한 축산업 종사자, 방역 실무자, 예찰 실무자, 백신 공급자 등의 현장 실무자 중심 요구를 반영하여 시스템 고도화

● 실시간 데이터 수집 및 활용 채널의 다변화를 위한 모바일 앱 개발

● 룰 기반 동물전염병 발병 가능성분석 및 확산 예측모델을 구축하고, 지속적인 모델 고도화를 통해, 목표시스템은 예방차원의 분석을 수행

1-2. 연차별 개발목표 및 내용

● 세부연구목표: 돼지 번식기계 관리시스템 안정화

1. 확립된 병원체 분석 프로토콜의 활용

- 번식기계질환 감염 의심 개체에서 샘플링한 질 분비물 및 정액 내 병원체 존재 여부를 확립된 병원체 감별 프로토콜을 활용해 분석

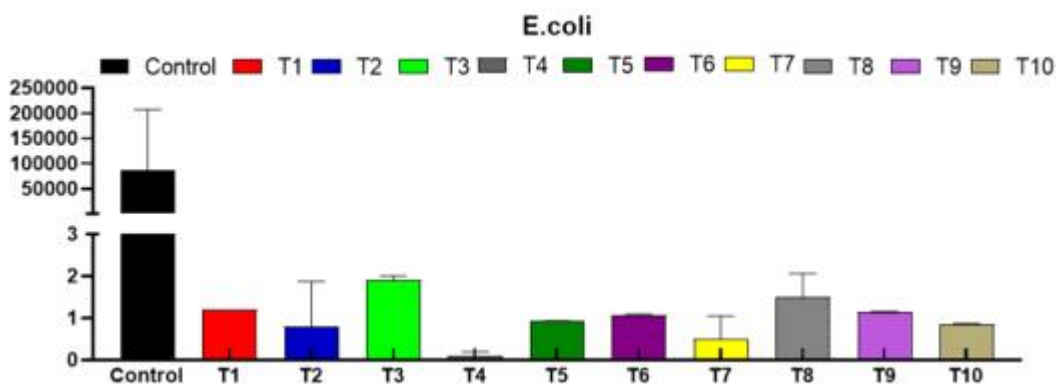


그림 25 번식기계질환 감염 의심이 되는 10마리의 돼지 정액에서 대장균(E.coli) 존재 여부를 qPCR을 통해 확인

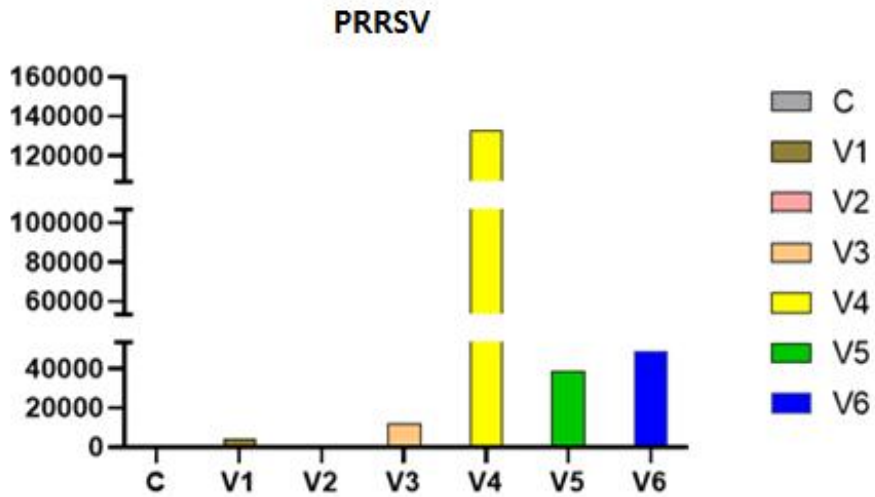


그림 26 번식기계질환 감염 의심이 되는 6마리의 암돼지의 질 분비물에서 *L. intracellularis* 존재 여부를 qPCR을 통해 확인

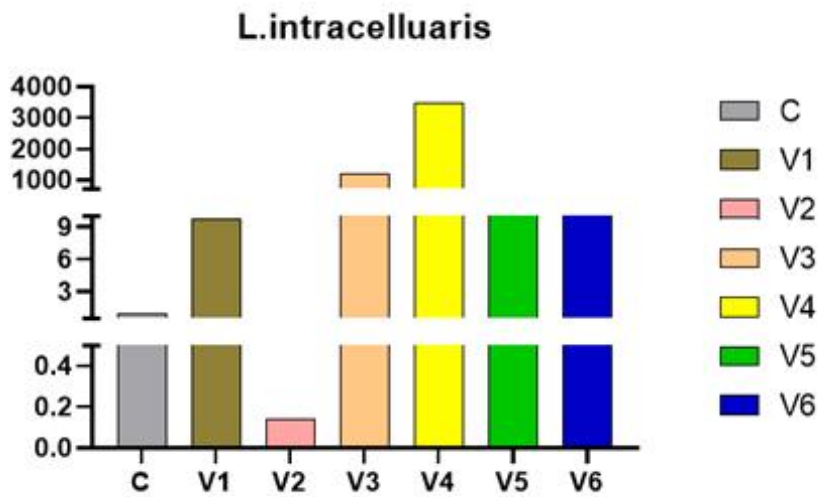


그림 27 번식기계질환 감염 의심이 되는 6마리의 암돼지의 질 분비물에서 *L. intracellularis* 존재 여부를 qPCR을 통해 확인

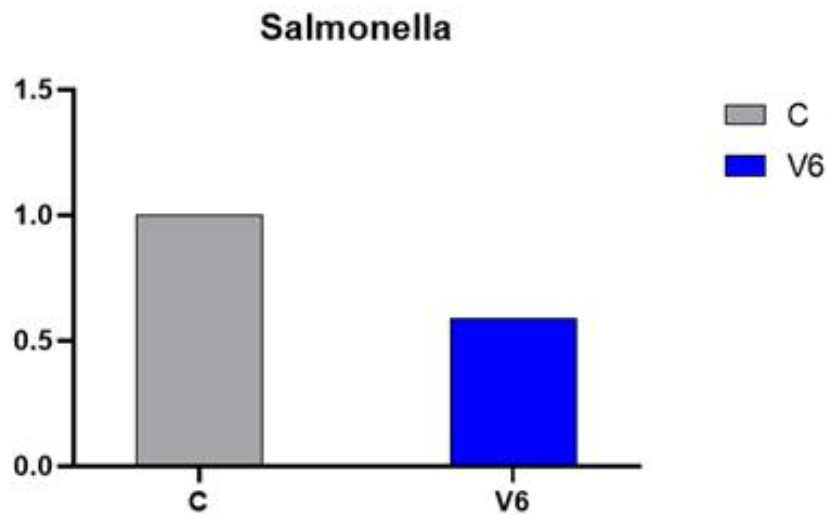


그림 28 번식기계질환 감염 의심이 되는 6마리의 암태지의 질 분비물에서 Salmonella 존재 여부를 qPCR을 통해 확인

2. 돼지 난모세포의 성숙과정 및 배아 발달과정 중에 사이토카인이 관여하는 신호전달 기전 분석 및 이를 활용한 돼지 체외 배아생산 시스템 개선

2-1. 사이토카인의 일종인 C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)를 활용한 돼지 난모세포 체외 성숙 (in vitro maturation; IVM) 시스템 최적화

CCL2 concentration (ng/mL)	No. of oocytes cultured for maturation*	Mean ± SEM (%) oocytes at the stage of			
		Germinal vesicle	Metaphase I	Anaphase I and Telophase I	Metaphase II
0 (Control)	158	1.8 ± 1.0	14.0 ± 1.8	2.3 ± 1.5	81.8 ± 1.8 ^a
1	158	1.4 ± 1.4	9.2 ± 3.7	1.2 ± 1.2	87.6 ± 2.1 ^{ab}
10	166	0.0 ± 0.0	5.2 ± 3.7	2.8 ± 2.8	91.5 ± 3.4 ^{ab}
100	158	0.0 ± 0.0	5.8 ± 3.9	1.2 ± 0.6	91.7 ± 3.6 ^b

*Three times replicates.

^{ab}Values with different superscripts within a column differ significantly ($p < 0.05$).

그림 29 돼지 난모세포 체외성숙 (IVM) 중 CCL2를 보충했을 때 핵성숙이 유의미하게 증가하는 것을 확인

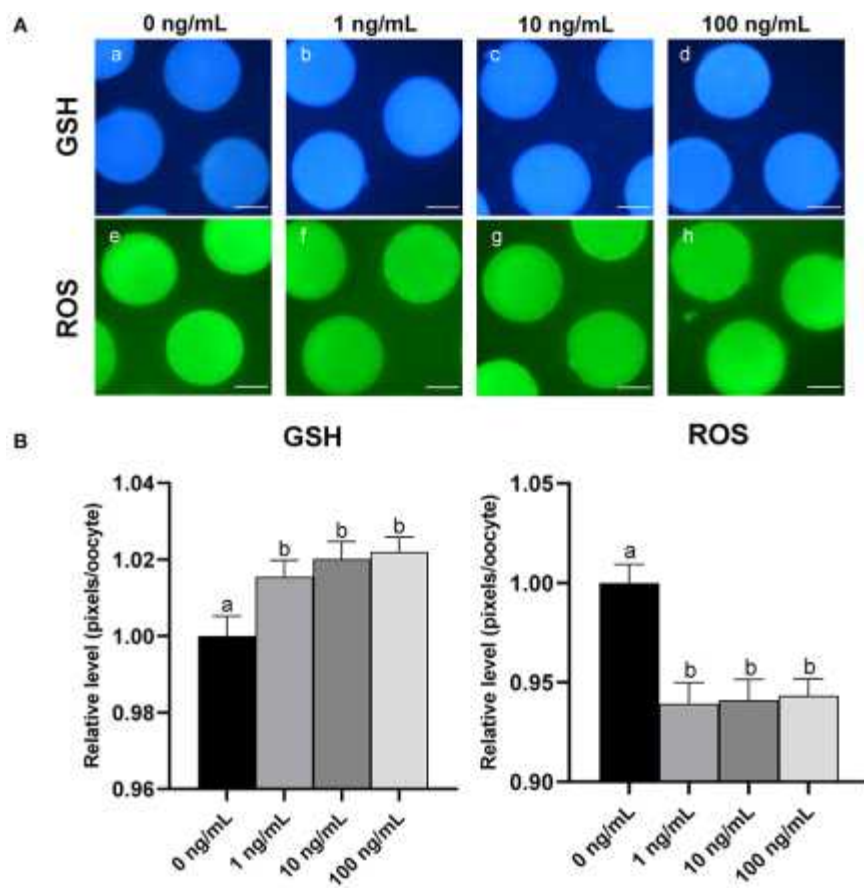


그림 30 돼지 난모세포 체외성숙 중 CCL2를 보충했을 때 세포질 성숙이 유의미하게 증가하는 것을 intracellular glutathione (GSH)와 reactive oxygen species (ROS)를 통해 확인

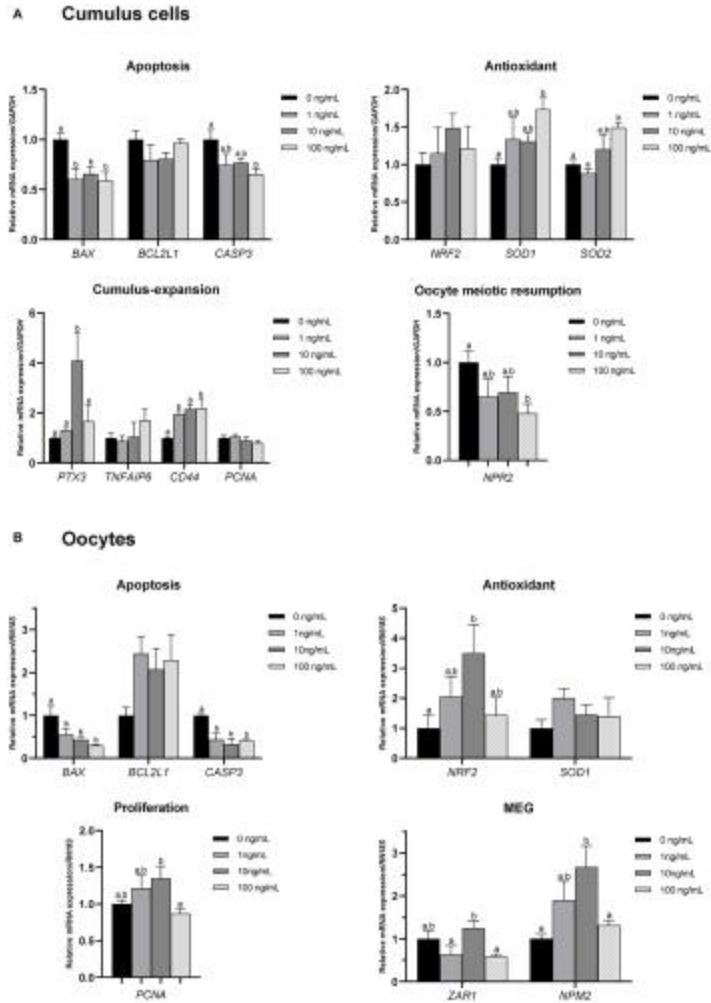
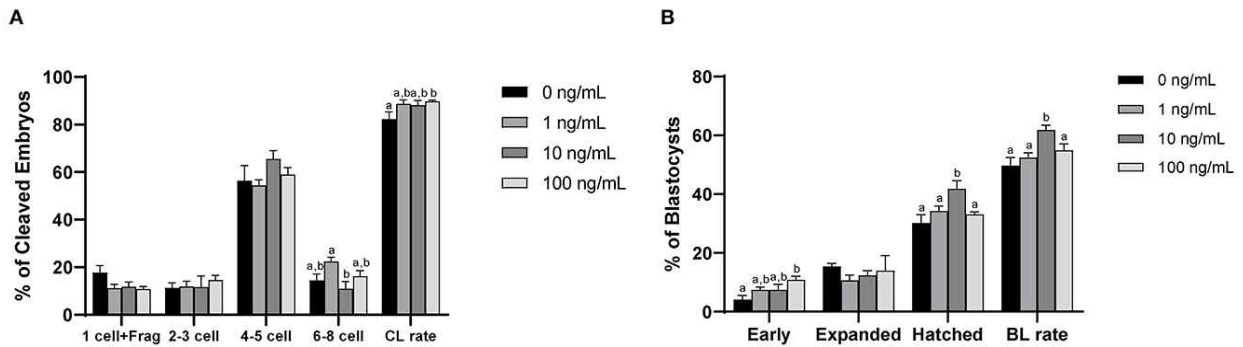


그림 31 돼지 난모세포 체외성숙 중 CCL2를 보충했을 때 apoptosis와 antioxidant 관련 mRNA 발현량이 증가 되는 것을 PCR로 확인



CCL2 concentration (ng/mL)	No. of Embryos cultured, N^*	No. (%) of Embryos developed to		Total cell number in blastocysts (n^{**})
		≥ 2 -cell	Blastocyst	
0 (Control)	148	122 (82.3 \pm 3.0) ^a	74 (49.8 \pm 2.7) ^a	59.3 \pm 4.2 (74)
1	160	142 (88.8 \pm 1.6) ^{a,b}	84 (52.5 \pm 1.6) ^a	62.3 \pm 4.1 (84)
10	162	143 (88.2 \pm 2.0) ^{a,b}	100 (61.8 \pm 1.7) ^b	69.7 \pm 1.4 (100)
100	166	149 (89.8 \pm 0.5) ^b	91 (54.9 \pm 2.2) ^a	50.5 \pm 9.7 (91)

N^* : Three times replicates. n^{**} : Number of blastocysts examined.

^{a,b}Values with different superscripts within a column differ significantly ($p < 0.05$).

그림 32 돼지 난모세포 체외성숙 중 CCL2를 보충했을 때 cleavage rate와 배아발달률을 증가시키는 것을 확인

2-2. 사이토카인의 일종인 과립구집락자극인자 (G-CSF)를 활용한 돼지 배아 체외생산 (in vitro production; IVP) 시스템 최적화

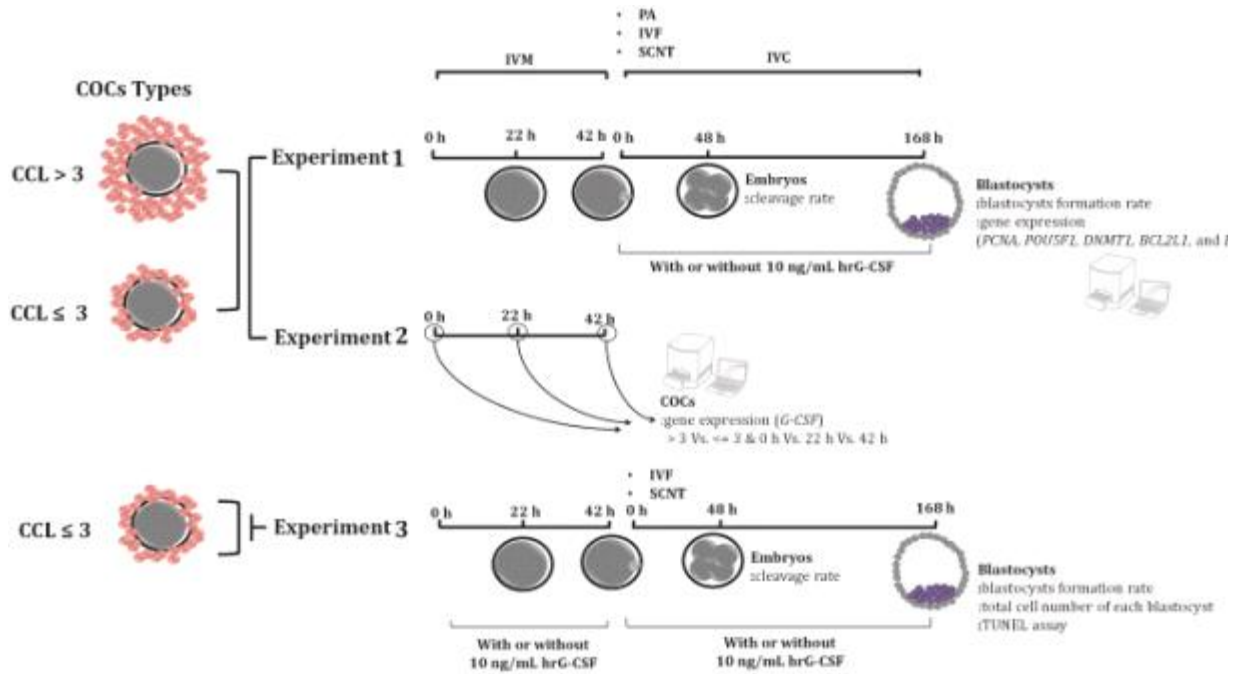


그림 33 전체적인 실험의 모식도. 난구세포가 3층 이상인 난모세포를 체외수정(in vitro fertilization; IVF), 단위생식(parthenogenesis; PA)과 체세포핵이식(somatic cell nuclear transfer; SCNT)을 해 배아를 생산하고 체외배양과정(in vitro culture; IVC)에 G-CSF를 처리하여 배아발달향상을 유도하는 지 확인.

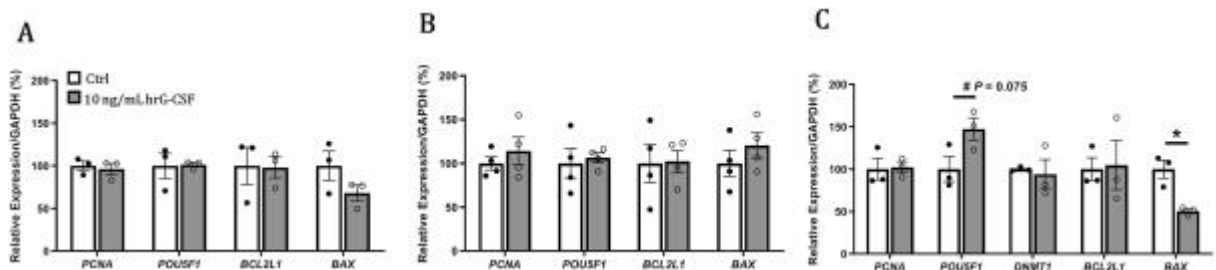


그림 34 IVC 동안 10ng/mL hrG-CSF를 보충한 후 CCL ≤3 유형 COC에서 유래된 배반포의 유전자 발현 분석

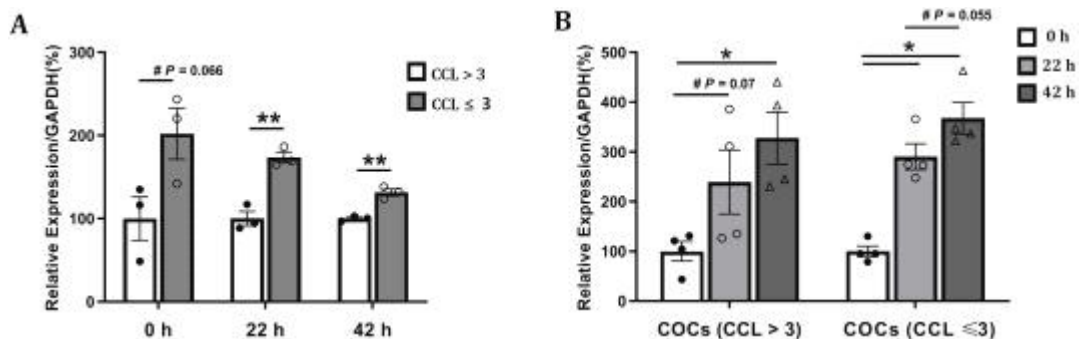


그림 35 돼지 난구난모세포 복합체(cumulus oocyte complex; COC)에서 G-CSF의 발현을 유형과 IVM기간에 따라 비교 확인

Groups IVM/IVC	No. of oocyte cultured (3) ^a	No. (%) of embryos developed to			
		≥2-cells (%) ^b	Blastocysts (%) ^b	Blastocysts (%) ^c	
-/-	83	58 (69.46±4.67)	21 (25.04±1.66)	21 (36.07±3.63) ^{ab}	
-/+	83	61 (73.45±1.49)	18 (22.27±3.51)	18 (30.50±3.03) ^a	
+/-	83	53 (63.52±6.27)	27 (32.28±5.26)	27 (50.11±5.03) ^b	
+/+	86	55 (64.40±4.49)	26 (29.87±3.63)	26 (47.56±4.77) ^{ab}	

^{a, b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

그림 36 CCL ≤3 유형 COC에서 파생된 체외 수정 배아의 발달 잠재력에 대한 hrG-CSF 보충 기간의 효과 확인

Groups IVM/IVC	No. of oocyte cultured (5) ^c	No. (%) of embryos developed to		
		≥2-cells (%) ^a	Blastocysts (%) ^a	Blastocysts (%) ^b
-/-	139	103 (74.10±2.38)	21 (15.11±1.64) ^a	21 (20.39±2.55) ^A
-/+	136	94 (69.12±1.81)	23 (16.91±2.04) ^a	23 (24.47±3.08) ^{AB}
+/-	143	109 (76.22±6.93)	44 (30.77±5.27) ^b	44 (40.37±6.01) ^C
+/+	143	95 (66.43±4.96)	32 (22.38±3.86) ^{ab}	32 (33.68±4.96) ^{BC}

^{a, b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

^{A-C} Values with different superscripts in the same column are tended to different ($P = 0.058$).

그림 37 CCL ≤3 유형 COC에서 파생된 복제된 배아의 발달 잠재력에 대한 hrG-CSF 보충 기간의 효과 확인

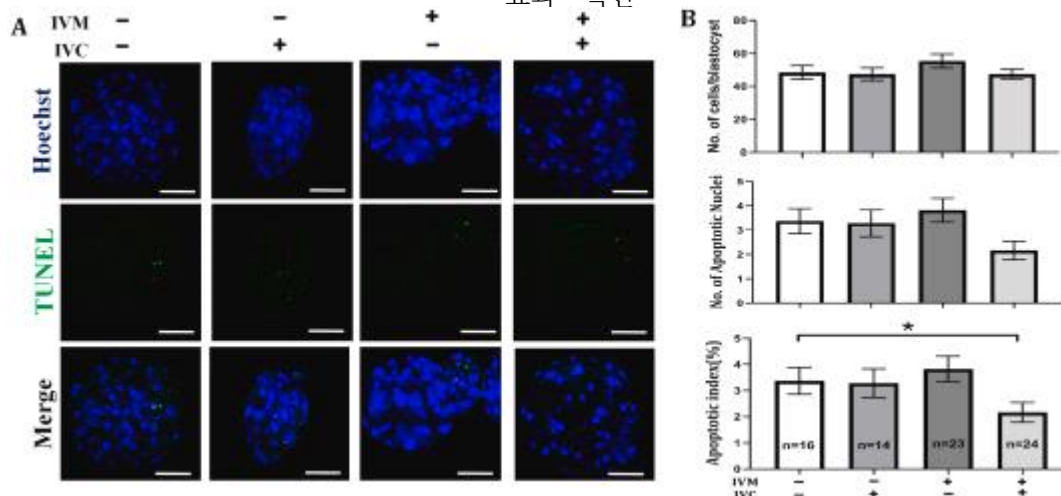


그림 38 G-CSF 보충 기간이 CCL ≤3 유형 COC에서 유래된 배반포의 세포사멸 발생률을 감소시키는 것을 확인

3. 돼지 만능성줄기세포를 활용한 영양막 세포 분화 가능성 분석-돼지 만능성 줄기세포주를 이용하여 자발적 분화 유도 및 영양막세포 특성분석

EBs_day 7 F12+mTeSR (1:1)

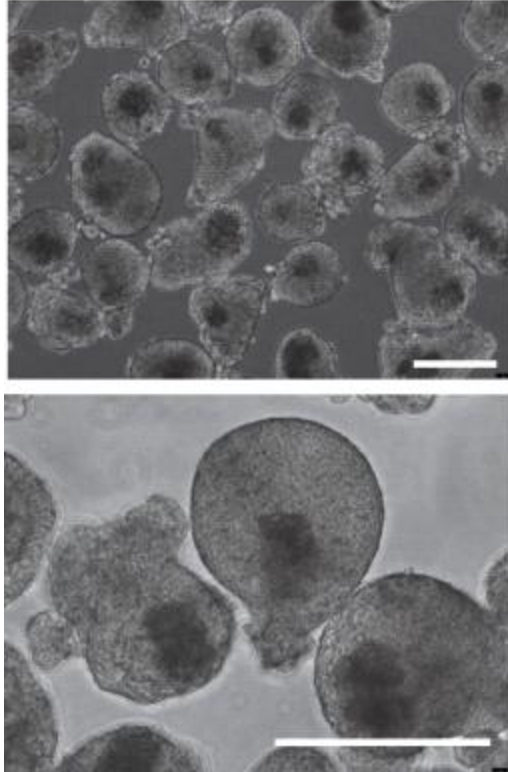


그림 39 돼지 체세포핵이식 유래 만능 배아줄기세포를 자발적으로 분화시켰을 때 7일째 Embryoid Body가 형성된 사진

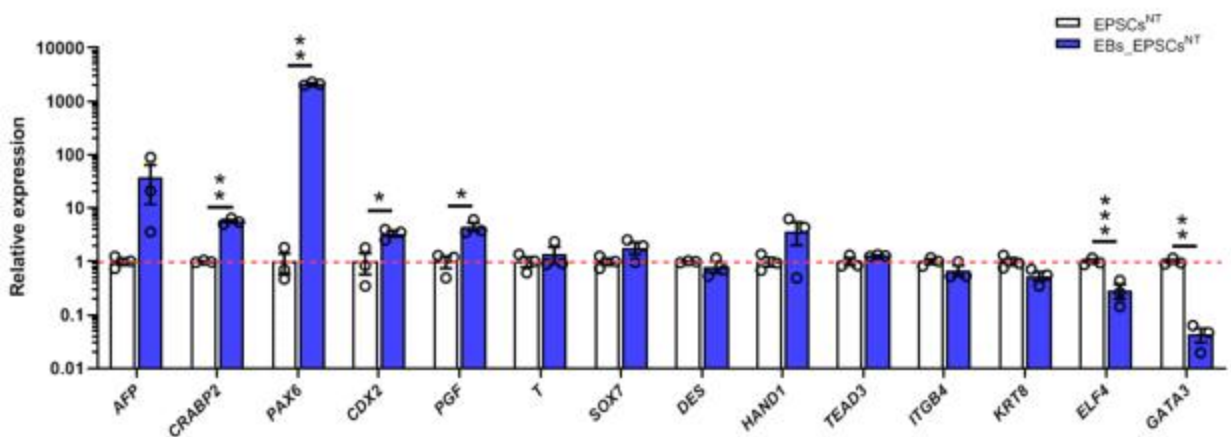


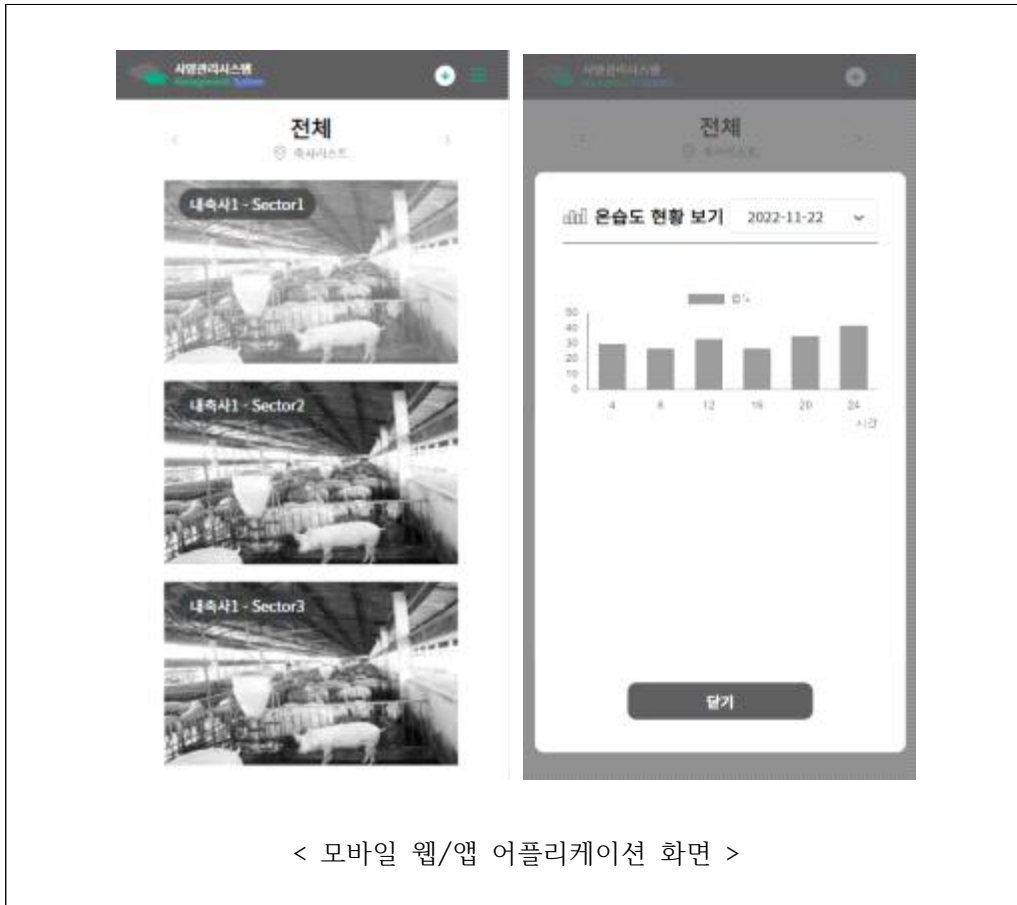
그림 40 Day 7일 째 Embryoid Body에 embryonic 랑 extra-embryonic lineage 관련 유전자들의 발현을 만능줄기세포에서 발현하는 Level이랑 서로 비교하여 영양막세포의 특성 분석

◎ 세부연구목표: ICT융합 동물전염병 관리시스템 안정화

1. 돈사 관리 모바일 어플리케이션 고도화

- 시스템 실 사용 간에 수정/보완 필요 기능 검토 및 추가 기능 검토 진행
- IoT를 활용한 데이터 및 현장 실무 요구사항을 추가 반영하여 고도화 진행

1.1 IoT 센서 모니터링 데이터 추가



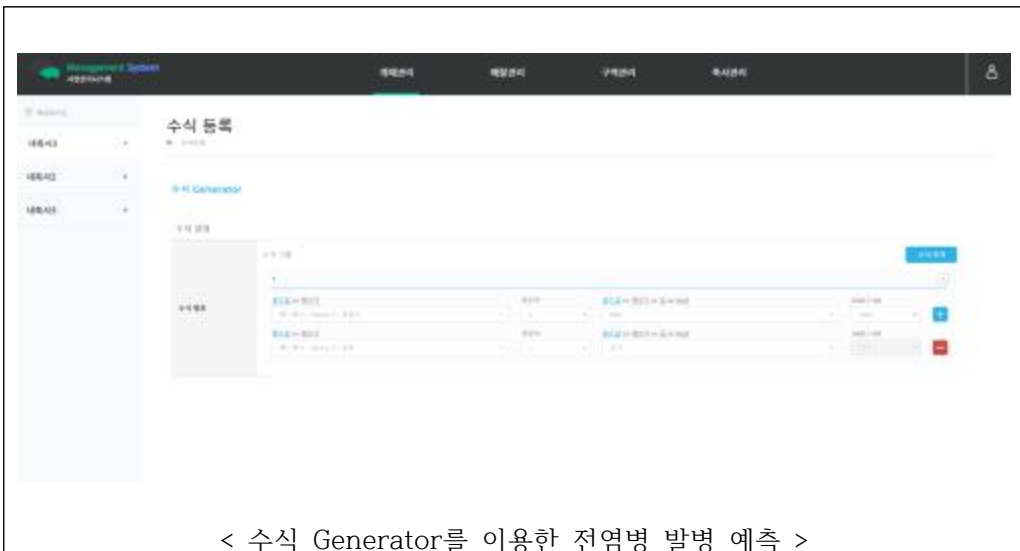
- 기존의 돈사 관리 시스템에서 개발된 IoT 센서 모니터링 시스템을 모바일 어플리케이션에서도 동작 가능한 기능 구축
- 모바일에서 온/습도 관리 모니터링을 진행하기 위하여 모바일 웹/앱 어플리케이션 개발 완료
- 온/습도 관리 모니터링을 통하여 IoT 센서로 수집된 데이터를 확인할 수 있도록 고도화 진행 완료

2. 룰 기반 동물 전염병 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 고도화

#	id	per_id	sector_id	type	date	den	person	next_date	fst_regist_date	lot_modify_date
1	23	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
2	24	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
3	25	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
4	26	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
5	27	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
6	28	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
7	29	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
8	30	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
9	31	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
10	32	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
11	33	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
12	34	22	26	2	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
13	35	22	26	2	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
14	36	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
15	37	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
16	38	22	26	2	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
17	39	22	26	1	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
18	40	22	26	2	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39
19	41	22	26	2	2023-11-08	우리공공부	김병철	2023-12-08	2023-11-08 17:56:39	2023-11-08 17:56:39

< 온/습도 센서 데이터 수집 결과 >

- 구역마다 설치된 온/습도 및 암모니아 센서 등 IoT 장비 데이터를 이용하여 발병 분석 및 가축 생활 환경에 대한 정보를 확인할 수 있는 데이터 구축



- 수식 Generaor를 통하여 수집된 온/습도 빅데이터를 이용한 전염병 발병 가능성을 예측하고, 해당 예측 데이터를 통하여 예측 모델 고도화 진행

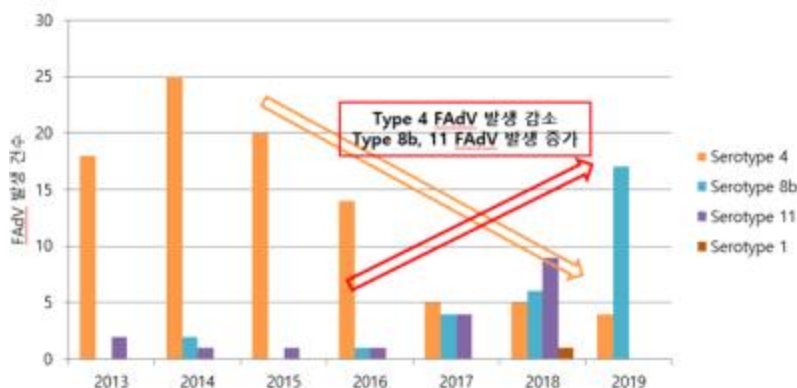
3. 국내 전체 확산 보급 및 해외 수출 추진

ARTICLE 5 VALIDITY, MODIFICATION AND TERMINATION OF THE AGREEMENT	
5.1	The Agreement will become valid and effective after being signed by both Parties.
5.2	Any modification or variation of the terms and conditions of the Contract, including any modification or variation of the scope of the Contract, may only be by mutual agreement between the Parties.
5.3	Should there be any cause to the Client to wish or decide to terminate the Agreement at any time while it is in force: 5.3.1 The Client shall serve to the Provider a thirty (30) days' notice stating in writing clearly the grounds of the notice; and 5.3.2 Upon expiry of the said notice period if the Client still so wishes, the Agreement shall stand terminated.
5.4	In the event of termination of the Agreement as provided for in Sub-Article 5.3 the Parties will square up the affairs between them including settlement of any outstanding account or accounts.
ARTICLE 6 EFFECT OF FORCE MAJEURE	
6.1	If either of the Parties hereto is unable to fulfill any of its obligations by reason of any occurrence beyond the control of any such Party, say, act of God, or act of Government or local authority, natural disaster, inclement weather, riots, strikes or lockouts, except for riots, strikes or lockouts attributable to any such Party's acts of commission or omission, such occurrence shall be deemed to constitute force majeure and provided that such Party can show: 6.1.1 that the Party immediately notified in writing the other Party of the occurrence; 6.1.2 that best endeavors were made to avoid the effect of the occurrence and limit its duration; and 6.1.3 the likely duration of the occurrence not being less than three (3) months, then, in such event the Agreement shall stand suspended for the duration of the occurrence and the Party so affected shall not be deemed to be in default of its particular obligation or obligations.
6.2	In the event the force majeure occurrence lasts for more than three (3) months, the Parties hereto will review the situation and agree as to whether to extend the suspension of the operation of the Agreement or to terminate the same.
< 터보소프트 - 수출 증빙 자료 >	

- 돈사 관리 프로그램을 통하여 다수의 축사 내에 시스템을 납품하여, 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 데이터화 진행
- 향후 프로그램 커스터마이징을 통하여 축사 이외에 적용할 수 있는 관리 프로그램 구축 예정

○ 1-1협동

1) 국내 가금 아데노바이러스 발생현황 조사



- 2013~2019년도까지 분리된 가금 아데노바이러스를 검사한 결과, type 4 FAdV 발생은 감소하였지만, type 8b, 11 FAdV 발생이 증가하는 추세를 보임
- Type 4 FAdV 사독백신은 2015년도에 출시되었으며 백신을 농가에 접종함으로써 type 4 FAdV 발생이 감소한 것으로 추정

2) 백신 후보주 선발 및 평가

Type 4	Type 8b	Type 11
[4-1] ADL181209	[8-1] ADL190066	[11-1] ADL180516
[4-2] ADL181210	[8-2] ADL190167	[11-2] ADL180549
[4-3] ADL190141	[8-3] ADL190187	[11-3] ADL180863
[4-4] ADL190530	[8-4] ADL190423	[11-4] ADL181300
[4-5] ADL190734	[8-5] ADL190639	[11-5] ADL182047
[4-6] ADL191223	[8-6] ADL191224	[11-6] ADL182185

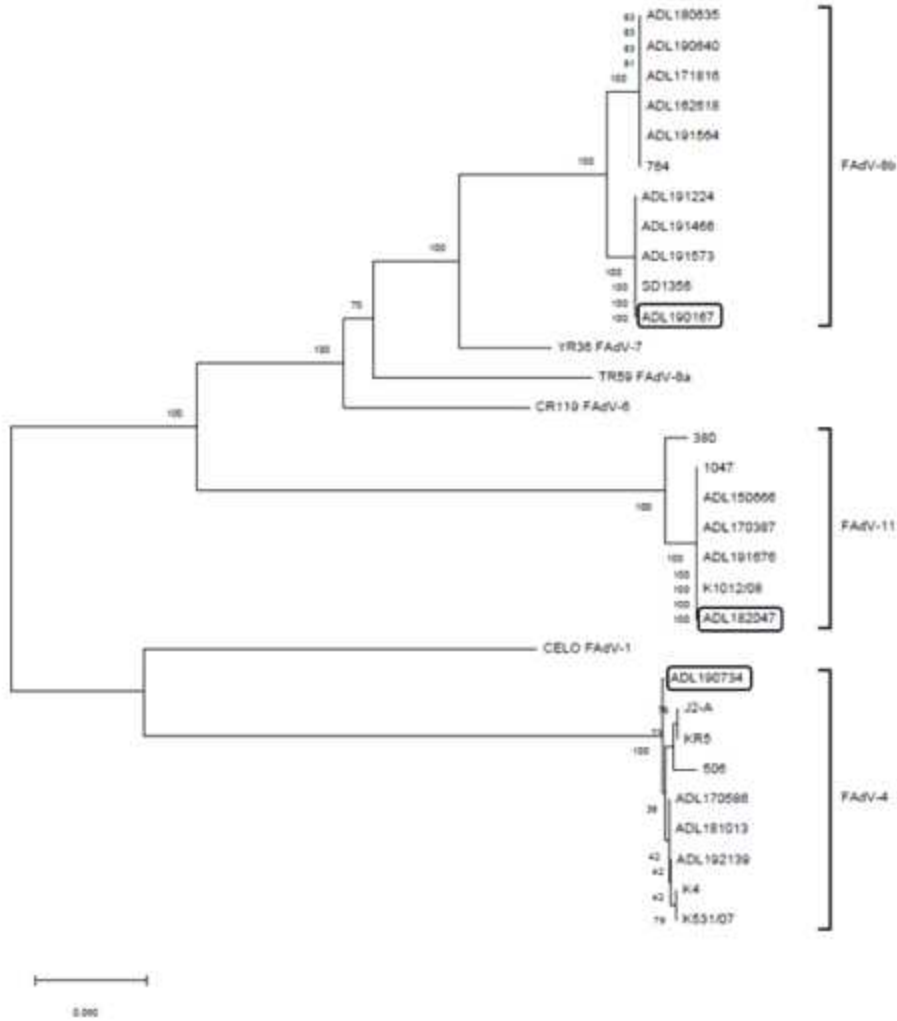
- (주)아비넥스트로부터 농가에서 폐사를 유발한 FAdV 혈청형 별로 각각 6개의 균주를 분양받음
- FAdV strain을 종란에 CAM(Chorioallantoic membrane)접종함으로써 순수 분리
- 병원성 평가 및 세포계대를 통해 백신 후보주 선발

Group	9주령 Mortality (%)
ADL190141 (4-3)	80%
ADL190734 (4-5)	100%
ADL190167 (8-2)	100%
ADL190187 (8-3)	0%
ADL180863 (11-3)	0%
ADL182047 (11-5)	40%

FAdV LMH cell adaptation 배양조건	
Cell line	LMH cell
바이러스 증식용 배양액	α -MEM + 5% FBS + 0.1% SP 항생제
바이러스 접종량	배양액의 1% volume (바이러스 함량 $10^{7.0}$ TCID ₅₀ /ml 기준)
배양 Scale	T25 Flask
배양 조건	37°C Incubator

- 배양 결과 각 바이러스 별로 $10^{7.3}$ ~ 7.5 TCID₅₀/ml로 배양
- SPF 닭을 사용하여 면역원성 비교 시험을 수행하여 최종 백신 후보주를 선발하였으며 이는 병원성이 가장 높았던 strain과 동일

4형: ADL190734, 8b형: ADL190167, 11형: ADL182047



3) 최종 백신후보주를 이용한 항원함량 결정시험 진행 [단일]

그룹	백신 유제수율	마릿수	공격항원
G1	4형 단일 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose	10	4형 ADL190734
G2	4형 단일 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose	10	
G3	8b형 단일 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose	10	8b형 ADL190167
G4	8b형 단일 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose	10	
G5	11형 단일 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose	10	11형 ADL182047
G6	11형 단일 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose	10	
G7	-	5	4형 ADL190734
G8	-	5	8b형 ADL190167
G9	-	5	11형 ADL182047

[결과]

그룹	중화항체 Positive rate	임상증상	폐사율
G1 (4형 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G2 (4형 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G3 (8b형 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G4 (8b형 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G5 (11형 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G6 (11형 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose)	10/10	0/10	0/10
G7 (4형 대조군)	0/5	5/5	5/5
G8 (8b형 대조군)	0/5	5/5	5/5
G9 (11형 대조군)	0/5	3/5	3/5

- 4형 대조군에서 간염, 간 종대 및 심낭수종을 확인하였으며 폐사를 보임
- 8b형 대조군에서 간염 및 간 종대를 확인하였으며 폐사를 보임
- 11형 대조군에서 간염 및 간 종대를 확인하였으며 폐사를 보임
- 모든 백신접종군에서 동종 혈청형 공격접종에 의한 임상증상 및 폐사가 확인되지 않음

동종 혈청형 항원에 대한 중화능

그룹	S/N 항원	S/N titer (Log ₂)									
		Individual No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	4형	8	8	8	8≤	8	8	8	8≤	8	7
G2	4형	8≤	8	8≤	8≤	8	7	7	8≤	8≤	8≤
G3	8b형	7	8	8	7	8≤	8	7	8≤	8≤	8
G4	8b형	8	8	8≤	8≤	8≤	8	8	8≤	8≤	8≤
G5	11형	7	8≤	8	8	7	7	8	8	8≤	8≤
G6	11형	8≤	8	8	8≤	8	7	8≤	8≤	8≤	8≤
G7	4형	<2	<2	<2	<2	<2					
G8	8b형	<2	<2	<2	<2	<2					
G9	11형	<2	<2	<2	<2	<2					

- 모든 항원 유제수율 10^{7.0} TCID₅₀/dose에서 충분한 항체형성능을 보임

이종 혈청형 항원에 대한 교차중화능

그룹	S/N 항원	S/N titer (Log ₂)									
		Individual No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	8b형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	11형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
G2	8b형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	11형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
G3	4형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	11형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
G4	4형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	11형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
G5	4형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	8b형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
G6	4형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	8b형	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

- 백신균주로 선발된 가금 아데노바이러스 4형, 8b형, 11형 항원은 이종 혈청형 항원에 대한 교차중화능이 없는 것으로 판단됨

4) 최종 백신 후보주를 이용한 항원함량 결정시험 진행 [혼합]

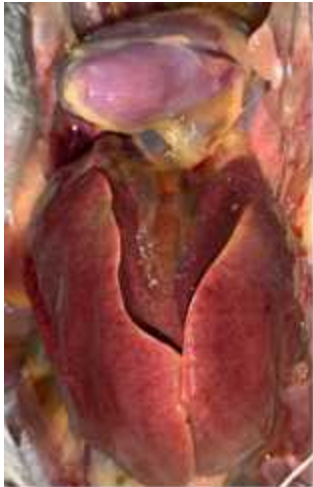
그룹	백신 유제수율	마릿수	공격항원
G1	4형, 8b형, 11형 혼합 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose	10	4형 ADL190734
G2		10	8b형 ADL190167
G3		10	11형 ADL182047
G4	4형, 8b형, 11형 혼합 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose	10	4형 ADL190734
G5		10	8b형 ADL190167
G6		10	11형 ADL182047
G7	-	5	4형 ADL190734
G8	-	5	8b형 ADL190167
G9	-	5	11형 ADL182047

[결과]

그룹		중화항체 Positive rate	임상증상	폐사율
G1	4형, 8b형, 11형 혼합 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /dose	10/10	0/10	0/10
G2		10/10	0/10	0/10
G3		10/10	0/10	0/10
G4	4형, 8b형, 11형 혼합 10 ^{7.5} TCID ₅₀ /dose	10/10	0/10	0/10
G5		10/10	0/10	0/10
G6		10/10	0/10	0/10
G7	-	0/5	5/5	5/5
G8	-	0/5	4/5	4/5
G9	-	0/5	3/5	3/5

- 4형 대조군에서 간염, 간 종대 및 심낭수종을 확인하였으며 폐사를 보임
- 8b형 대조군에서 간염 및 간 종대를 확인하였으며 폐사를 보임
- 11형 대조군에서 간염 및 간 종대를 확인하였으며 폐사를 보임
- 모든 백신접종군에서 임상증상 및 폐사가 확인되지 않음

공격접종 후 부검소견



4형 대조군 폐사계



8b형 대조군 폐사계



11형 대조군 폐사계



4형 시험군 생존계



8b형 시험군 생존계



11형 시험군 생존계

- 대조군 폐사계의 경우 간 종대, 출혈 및 괴사반점, 일부 심낭 수종 등의 부검 소견이 확인됨
- 시험군 생존계의 경우 정상적인 소견만 확인됨

혼합 시험백신에 대한 항체형성능 확인시험 결과

그룹	S/N 항원	S/N titer (Log ₂)									
		Individual No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	4형	8	8≤	8≤	8	8	8≤	8	8	8	8≤
G2	8b형	8≤	8	8≤	7	8	8≤	8≤	8≤	8	8
G3	11형	7	8	8≤	7	8	8≤	8	8≤	8≤	8
G4	4형	8	8	8	7	8	8≤	7	8≤	8	8
G5	8b형	8	7	8	8	8≤	8	8≤	8	7	8≤
G6	11형	8	7	8	7	8≤	8≤	8	8	7	8≤
G7	4형	<2	<2	<2	<2	<2					
G8	8b형	<2	<2	<2	<2	<2					
G9	11형	<2	<2	<2	<2	<2					

- 단일 시험과 동일하게 혼합 사독백신도 각각의 항원 유제수율 7.0 TCID₅₀/dose에서 충분한 항체형성능을 보임

5) 야외임상 시험

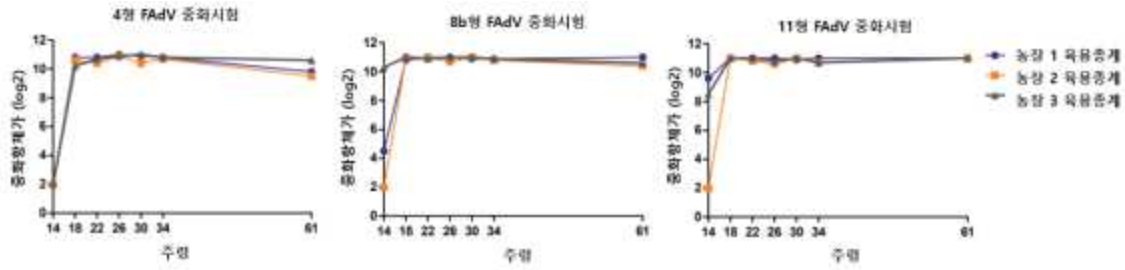
- 총 3개의 육용종계 농장, 7만 수 대상으로 임상시험 수행
- 14-15주령 백신 접종, 안전성[접종 부작용, 산란율, 부화율 및 폐사율] 및 효능[중계군 면역 지속능, 후대 병아리 모체이행항체 지속능 및 공격접종 방어능 확인] 평가 진행
- 3개 임상시험농장 모두 백신 접종 후 부작용은 확인되지 않았고, 정상적인 수준의 폐사율이 확인

중계군 산란율 및 부화율

시험항목	구분	표준 편차(%)	산란율(%)		구분	표준 편차(%)	부화율(%)		구분	표준 편차(%)	산란율(%)		구분	표준 편차(%)	부화율(%)	
			사망백신 접종군	대조백신 접종군			사망백신 접종군	대조백신 접종군			사망백신 접종군	대조백신 접종군				
산란율	1	1.4	51.1	51.1	1	1.4	49.7	49.7	1	1.4	51.1	51.1	1	1.4	51.1	51.1
	2	1.4	51.1	51.1	2	1.4	49.7	49.7	2	1.4	51.1	51.1	2	1.4	51.1	51.1
	3	1.4	51.1	51.1	3	1.4	49.7	49.7	3	1.4	51.1	51.1	3	1.4	51.1	51.1
	4	1.4	51.1	51.1	4	1.4	49.7	49.7	4	1.4	51.1	51.1	4	1.4	51.1	51.1
	5	1.4	51.1	51.1	5	1.4	49.7	49.7	5	1.4	51.1	51.1	5	1.4	51.1	51.1
	6	1.4	51.1	51.1	6	1.4	49.7	49.7	6	1.4	51.1	51.1	6	1.4	51.1	51.1
	7	1.4	51.1	51.1	7	1.4	49.7	49.7	7	1.4	51.1	51.1	7	1.4	51.1	51.1
	8	1.4	51.1	51.1	8	1.4	49.7	49.7	8	1.4	51.1	51.1	8	1.4	51.1	51.1
	9	1.4	51.1	51.1	9	1.4	49.7	49.7	9	1.4	51.1	51.1	9	1.4	51.1	51.1
	10	1.4	51.1	51.1	10	1.4	49.7	49.7	10	1.4	51.1	51.1	10	1.4	51.1	51.1
	11	1.4	51.1	51.1	11	1.4	49.7	49.7	11	1.4	51.1	51.1	11	1.4	51.1	51.1
	12	1.4	51.1	51.1	12	1.4	49.7	49.7	12	1.4	51.1	51.1	12	1.4	51.1	51.1
	13	1.4	51.1	51.1	13	1.4	49.7	49.7	13	1.4	51.1	51.1	13	1.4	51.1	51.1
	14	1.4	51.1	51.1	14	1.4	49.7	49.7	14	1.4	51.1	51.1	14	1.4	51.1	51.1
	15	1.4	51.1	51.1	15	1.4	49.7	49.7	15	1.4	51.1	51.1	15	1.4	51.1	51.1
	16	1.4	51.1	51.1	16	1.4	49.7	49.7	16	1.4	51.1	51.1	16	1.4	51.1	51.1
	17	1.4	51.1	51.1	17	1.4	49.7	49.7	17	1.4	51.1	51.1	17	1.4	51.1	51.1
	18	1.4	51.1	51.1	18	1.4	49.7	49.7	18	1.4	51.1	51.1	18	1.4	51.1	51.1
	19	1.4	51.1	51.1	19	1.4	49.7	49.7	19	1.4	51.1	51.1	19	1.4	51.1	51.1
	20	1.4	51.1	51.1	20	1.4	49.7	49.7	20	1.4	51.1	51.1	20	1.4	51.1	51.1
부화율	1	1.4	51.1	51.1	1	1.4	49.7	49.7	1	1.4	51.1	51.1	1	1.4	51.1	51.1
	4	1.4	51.1	51.1	4	1.4	49.7	49.7	4	1.4	51.1	51.1	4	1.4	51.1	51.1
	8	1.4	51.1	51.1	8	1.4	49.7	49.7	8	1.4	51.1	51.1	8	1.4	51.1	51.1

- 3개 임상시험 농장 모두 정상적인 수준의 산란율과 산란 peak를 형성하였으며 부화율 또한 정상 수준으로 확인

종계군 면역지속능



- 1농장: 백신접종 전 8b형, 11형 중화 항체 양성
- 2농장: 백신접종 전 중화 항체 모두 음성
- 3농장: 백신접종 전 8b형, 11형 중화 항체 양성

- 각 농장 별 백신접종 전 야외감염이 있는 경우가 있어 사전 항체가 존재여부는 상이함
- 사전 항체가 존재여부와 상관없이 3가지 혈청형 모두에 대한 충분한 수준의 중화항체가 지속 확인

후대병아리 모체이행항체

Days of age	Group	FAV-4(A2L19074) S/N titer (log2) of progeny
1	Vaccinated	9 10 9 10 10 10 10 9 10 10 10
	Control	10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10
5	Vaccinated	9 9 7 8 8 7 8 8 8 8 8
	Control	8 9 10 10 8 8 7 8 9 8 8
10	Vaccinated	8 9 7 8 7 8 7 8 8 8 7
	Control	8 9 10 10 8 7 8 8 8 7 8
15	Vaccinated	5 7 7 8 8 7 7 7 9 8 8
	Control	7 7 7 5 8 8 8 7 8 7 7

- 시험백신을 접종한 종계군에서 생산된 후대병아리와 대조백신(혈청형 4형 단일백신)을 접종한 종계군에서 생산된 후대병아리를 대상으로 1, 5, 10, 15일령에 채혈하여 각 혈청형별 중화항체가를 확인
- 시험백신 접종 그룹의 경우 15일령까지 평균 2^6 수준의 중화항체가를 3종 혈청형에서 모두 확인
- 대조백신 접종 그룹의 경우, 농장별 야외감염 상황에 따라 상이하지만, 시험백신 접종 그룹의 중화항체가를 상회하지 않음

후대병아리 공격접종 방어능 평가

Group	Challenge strain	No. of chickens	Survival	Recovery	Hygiene
Vaccinated	FAV-4	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-8	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-11	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-4	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-8	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-11	10/10	10/10	10/10	10/10
Control	FAV-4	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-8	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-11	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-4	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-8	10/10	10/10	10/10	10/10
	FAV-11	10/10	10/10	10/10	10/10

- 시험백신을 접종한 종계군에서 생산된 후대병아리와 대조백신(혈청형 4형 단일백신)을 접종한 종계군에서 생산된 후대병아리, 그리고 같은 일령의 SPF 병아리를 대상으로 15일령에 3가지 혈청형의 공격접종 바이러스를 각각 접종하여 방어능을 평가

- 시험백신 접종 종계군의 후대병아리는 0~10%의 폐사율, 대조백신 접종 종계군의 후대병아리는 0~100%의 폐사율, SPF 병아리는 100%의 폐사율 확인

6) 포울샷® 아데노 3가 동물용의약품 제조품목 허가 승인



- 2023년 3월 31일 포울샷® 아데노 3가 제조품목허가 승인 완료

7) 포울샷® 아데노 3가 런칭세미나

중양백신연구소, '포울샷 아데노 3가' 런칭세미나 개최

* 품가물 11대 | 중양 2023.06.04 14:06



포울샷 아데노 3가 백신 성공률 99.9%에 달하면 영미산에 미치지 못해 7년시간을 확보 했다

"아데노 교차방어 거의 불가"...철혈형 모두 집중해야

2023.06.07 09:00 | 동물 2023.06.07 14:11

스릴리움 +



[축산신문 김연필 기자]

중양백신연구소 '포울샷아데노 3가' 런칭세미나
국내 최초 아데노 3가 백신...오는 9월 출시 예정

- 2023년 7월 런칭 세미나를 개최하여 본 제품에 대한 홍보를 진행
- 국내 주요 종계회사, 동물용의약품 대리점, 동물병원, 관련 매체 기자 등 참석

8) 포울샷[®] 아데노 3가 제조 및 국가검정 합격



대한정부보위 연구의 중요성을 다시 한번 강조합니다.

농림축산검역본부

수신 (주)중앙백신연구소 (경유)
 제목 동물용의약품 국가출하승인검정 신청 결과 알림

귀사에서 국가출하승인 검정 신청하신 아래의 제품을 검정한 결과, 붙임과 같이 합격 되었음을 알려 드립니다.

신청번호	제품명	검정기관명	제조번호	검정결과
23-5094	포울샷 아데노 3가	조류 아데노바이러스 불활화백신	323FADNT01	합격
23-5095			323FADNT02	

- 붙임 1. 23-5094 출하승인결과서(포울샷 아데노 3가, 323FADNT01, 중량)
 2. 23-5095 출하승인결과서(포울샷 아데노 3가, 323FADNT02, 중량), 붙



- 포울샷[®] 아데노 3가 정규 Lot 제조(2023년 4월)
- 포울샷[®] 아데노 3가 국가출하승인검정 합격(2023년 9월)

9) 포울샷[®] 아데노 3가 판매 개시

<한국동물약품협회 판매실적현황 신고 페이지>

2023년 12월 생산-수출입-판매 실적현황

No.	회사/연구구명	품목코드	제품명	별명명	허가일자	허수일자	년월	당월수량 (총량)	당월금액 (총량)	누계수량 (총량)	누계금액 (총량)	당월수량 (수출)	당월금액 (수출)	누계수량 (수출)	누계금액 (수출)
1	중앙백신	H-0235	포울샷 [®] 아데노 3가	Pooshot [®] Adeno 3	2023-03-31		2023-03-31	42,320	1,306,151,980	0	0	0	0	0	0

- 2023년 12월 기준 국내 매출액 1억 6천여만원

○1-2 협동

*1차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 원인균의 분리, 동정

○ 국내 요네병 감염 개체 검사

국내 농장의 요네병 감염우의 검사는 혈청학적 방법과 분변내 균 검색 및 분리동정법을 사용하여 실시하였다. 혈청학적 검사는 ELISA test (IDEXX Lab, USA) 을 사용하여 수행하였으며, fecal PCR은 소 분변으로부터 DNA를 직접 추출하여, 요네병균 특이적 유전자인 IS900 및 ISMap02 유전자를 real-time PCR 로 검출하여 확인 하였다. Fecal PCR에서 양성인 개체들의 분변으로부터 균 분리를 수행하였다. 균 분리는 미국 동물질병진단센터(National Animal Disease Center)에서 제안한 표준 전처리 방법으로 전처리 후 VersaTREK ParaJEM system을 이용하여 수행하였다. VersaTREK에서 양성인 개체들 경우 요네병균 분리배지 (modified Herrold's egg york medium with mycobactin J 또는 7H10 agar plate)를 사용하여 37°C에서 6 주간 배양후 특이적인 집락을 선발하였고, 이 집락의 genomic DNA 를 추출하여 PCR 검사를 통해 요네병균 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 로 확정하였다. 혈청학적 검사는 ELISA 법을 사용하였으며, 제조사 (IDEXX Lab) 측에서 제공한 시험방법에 따라 실시하였고, S/P ratio 에 따라 양성, 의양성, 음성으로 구분하였다.

○ 국내 요네병 감염 개체 검사 수행 결과

국내 요네병 감염실태를 파악하기 위하여 전국 12개 지역 1,273두의 소의 분변 PCR 및 혈청 ELISA 검사를 진행하였다. 분변 PCR 및 혈청학적 검사결과 분변내 PCR검사에서는 0.7%, 혈청학적 검사에서는 4.13%의 양성율을 나타내었다 (표 1). 분변 검사에서 양성 및 의양성을 나타낸 개체들의 분변을 VersaTREK system 및 요네병균 분리 배지를 사용하여 배양 및 PCR 기법을 통해 야외분리주로 동정하였고, 이를 통해 야외 분리주를 4주를 확보하였다.

표 1. 국내 사육소로부터 수집한 분변 및 혈청에 대한 요네병 검사결과

구 분	검사두수	양성개체수	음성개체수	양성율
fecal PCR	1,132	8	1,124	0.7%
ELISA	459	19	440	4.13%

A 목장의 각 개체별 분변 PCR 검사와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 2 와 같다.

표 2. A 목장에서 Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	X	-	3.9
2	X	-	2.7
3	X	-	2.1
4	X	-	3.2
5	X	-	1.5
6	X	-	5.5
7	X	-	2.1
8	X	-	2.2
9	X	-	40.6
10	1X	-	양성 (115.4)

11	1X	-	양성 (148.5)
12	1X	-	1.1
13	1X	-	2.7
14	1X	-	2.5
15	1X	-	1.0
16	1X	-	2.1
17	1X	-	양성 (163.3)
18	1X	-	1.3
19	1X	-	4.4
20	2X	-	2.5
21	2X	-	1.5
22	2X	-	6.9
23	2X	-	1.5
24	2X	-	42.6
25	2X	-	1.7
26	2X	-	3.7
27	2X	-	1.0
28	2X	-	1.2
29	2X	-	3.5
30	3X	-	1.6
31	3X	-	1.6
32	3X	-	0.9
33	3X	-	4.3
34	3X	-	4.0
35	3X	-	7.2
36	3X	-	6.9
37	3X	-	3.1
38	3X	-	3.1
39	3X	-	2.1
40	4X	-	2.8
41	4X	-	2.1
42	4X	-	1.8
43	4X	-	6.2
44	4X	-	5.0
45	4X	-	1.8
46	4X	-	7.7
47	4X	-	4.8
48	4X	-	2.0
49	4X	-	4.3
50	5X	-	45.8
51	5X	-	1.7
52	5X	-	2.3
53	5X	-	2.7
54	5X	-	4.8
55	5X	-	4.4
56	5X	-	2.9
57	5X	-	2.5
58	5X	-	7.8
59	5X	-	2.6
60	6X	-	1.5
61	6X	-	3.4
62	6X	-	3.5
63	6X	-	2.9
64	6X	-	1.5
65	6X	-	8.0
66	6X	-	3.6
67	6X	-	2.0
68	6X	-	3.1
69	6X	-	16.2
70	7X	-	1.7
71	7X	-	0.7
72	7X	-	1.2

73	7X	-	0.9
74	7X	-	2.5
75	7X	-	2.1
76	7X	-	2.3
77	7X	-	13.7
78	7X	-	9.8
79	7X	-	3.7
80	8X	-	11.7
81	8X	-	2.8
82	8X	-	8.6
83	8X	-	10.3
84	8X	-	3.4

2. 국내 사용 요네병 검사법에 대한 비교 검토

○ 국내 사용 요네병 혈청학적 진단법의 비교

현재 국내에서 요네병 검사를 위해 사용하고 있는 혈청학적 진단법의 각각의 장, 단점을 가지고 있어 이들 두가지 ELISA 법 [Kit A (IDEXX Lab, USA), Kit B (IDvet innivative, France) 의 상호비교와 이들 개체의 분변내 균 (real-time PCR) 검출법을 상호 비교하여 소 요네병에 대한 효율적인 검사방법을 확립하고자 하였다.

두가지 ELISA kit 간 결과 비교 및 fecal PCR과의 일치도를 비교한 결과 두가지 혈청학적 검사 방법인 kit A와 kit B 사이에는 비교적 높은 일치도를 보였다. 그러나, 두가지 방법간에 위양성 (false positive) 과 위음성 (false negative) 를 보이는 개체들이 있어서 이들의 효율적인 검출을 위해서는 두 kit를 상호 보완적으로 사용한 요네병 혈청학적 진단의 적용이 필요하다고 판단된다 (그림 1).

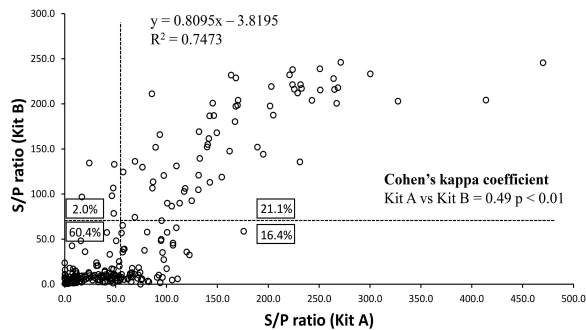


그림 1. 요네병 혈청학적 진단법 Kits A와 B간의 비교

요네병의 혈청학적 검사결과와 소 분변내 PCR 검사결과를 비교 분석한 결과 fecal PCR 검사와 혈청학적 검사결과간의 일치율은 낮아다 (표 3). 이들간의 상관관계를 소의 연령대별로 분석한 결과 연령대가 낮은 개체에서는 fecal PCR에서 양성율이 높았고, 연령대가 높은 개체에서는 혈청학적 양성율이 높았다 (그림 2).

표 3. Kit A 와 B 을 이용한 혈청학적 검사결과와 분변내 균 검색법의 비교

Fecal PCR	ELISA				Total
	Both positive	Kit A only	Kit B only	Both negative	
Positive	25	2	2	31	60
Negative	37	43	4	127	211
ND	1	4	0	22	27
Total	63	49	6	180	298

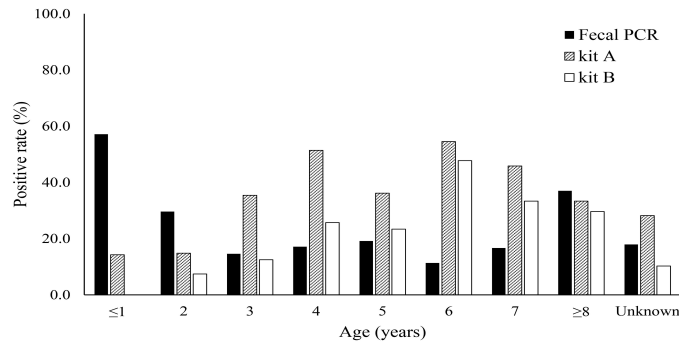


그림 2. Fecal PCR 및 혈청학적 검사결과 연령별 양성율

위 결과를 종합하여 볼때에 소 요네병의 주요 감염원인 준임상형 균배출우 (subclinical fecal shedder) 을 효율적으로 검출하고, 농장내 요네병 근절을 위해서는 fecal PCR 및 혈청학적 검사인 ELISA 기법을 상호 보완적으로 사용되어야 하며 연속적인 검사로 양성 개체를 지속적으로 검출, 도태시키는 것이 소 요네병 근절을 위한 필수적이라고 생각한다.

3. 국내 소 류코시스 감염실태 조사

- 소 류코시스는 국가의 가축전염병 중 중점관리 대상 밖에 있어 정확한 감염실태에 대한 조사가 없었고, 젓소에서 40~50% 정도 감염되어 있을 것으로 추정 되어진다.
- 소 류코시스의 검사는 전통적으로 AGID법(Agarose gel immuno-diffusion법)을 이용하여 진단하였으나, 결과판정의 문제 등으로 인해 현재는 혈청 ELISA법에 의한 항체가 측정이 일반적으로 진단에 사용되고 있다.
- 그러나 소 류코시스에 이환된 소에는 Lymphocyte 수의 증가가 나타나므로 이러한 수치를 신속 진단에 이용하기도 한다. 즉, CBC(Complete blood cell count) 검사 만으로 소 류코시스의 검사가 가능하다면 ELISA검사보다 쉽고 신속하게 진단이 가능할 수 있다. 이에 따라 CBC 검사를 통해 소 류코시스 이환 의심개체를 선별하여 해당 샘플에 대한 ELISA검사를 실시하고, 이 두가지 검사에 대한 일치도를 확인하였다.
- 2020년 11월까지 젓소목장 12개소 446두, 한우목장 10개소 158두에서 혈액 샘플링을 실시하여 CBC 검사를 완료하였다.

구분	검사두수	양성개체수	음성개체수	양성율
젓소	446	105	341	23.5%
한우	158	3	155	1.9%
총	604	108	496	17.9%

[CBC 검사를 이용한 소 류코시스 이환 의심 개체 선별]

※ 2차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

국내 사육 소 농장에서 요네병을 검색하기 위해 국내 6개의 도에서 142개 소 분변과 119점의 혈청을 수집하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 소 분변 및 혈청의 검사는 1차년도와 동일한 방법으로 실시하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP 의 분리, 동정을 실시하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

총 153두의 소에서 채취한 142개 분변 샘플, 119점의 혈청 샘플에서 진단검사를 진행하여 각각 분변에서 5두 (3.5%), 혈청에서 3두 (2.5%)에서 국내 사육 소의 요네병 양성을 확인하였다 (표 4). 이중 1두는 분변과 혈청에서 모두 양성을 나타내었다.

표 4. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
양성	5	3
음성	137	116

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 5 와 같다.

표 5. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단 검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	2X	-	3.3
2	4X	-	8.8
3	5X	-	2.3
4	6X	-	3.7
5	9X	-	51.3
6	1X	-	양성 (138.3)
7	1X	-	2.3
8	2X	-	11.0
9	2X	-	1.2
10	2X	-	6.8
11	2X	-	1.9
12	2X	-	0.7
13	2X	-	1.2
14	3X	-	6.5
15	3X	양성	3.1
16	3X	-	1.6
17	3X	-	4.5
18	3X	양성	양성 (75.7)
19	3X	-	10.3
20	3X	-	7.9
21	3X	-	4.4
22	4X	-	1.9
23	4X	-	3.4
24	4X	-	2.4
25	4X	-	8.6
26	4X	-	21.6
27	5X	-	4.6
28	5X	-	43.6
29	5X	-	2.7
30	5X	-	1.1
31	5X	-	15.2
32	5X	-	5.6
33	5X	-	양성 (154.3)

34	5X	-	8.2
35	6X	-	16.8
36	6X	-	2.5
37	6X	-	13.0
38	6X	-	3.5
39	6X	-	7.7
40	6X	-	3.4
41	6X	-	2.8
42	6X	-	2.6
43	6X	양성	10.0
44	6X	-	5.1
45	7X	-	3.3
46	7X	-	4.9
47	7X	-	2.3
48	7X	-	6.8
49	7X	-	5.6
50	7X	-	2.7
51	7X	-	1.7
52	7X	-	1.5
53	7X	양성	-
54	8X	-	5.3
55	8X	-	2.5
56	8X	-	5.1
57	8X	-	4.0
58	8X	-	12.8
59	8X	-	8.8
60	8X	-	5.7
61	8X	-	5.1
62	8X	-	6.3
63	8X	-	8.2
64	9X	-	15.8
65	9X	-	9.8
66	9X	-	10.4
67	9X	-	2.7
68	9X	-	3.6
69	9X	-	3.6
70	9X	-	3.8
71	9X	-	15.2
72	9X	-	6.5
73	9X	-	5.7
74	10X	-	5.3
75	SFXX	양성	32.9
76	2X	-	-
77	SFXX	-	-
78	5X	-	-
79	15XX 602XX	-	2.8
80	15XX 603XX	-	2.9
81	15XX 580XX	-	3.2
82	15XX 632XX	-	2.8
83	15XX 228XX	-	3.2
84	15XX 430XX	-	2.9
85	15XX 495XX	-	9.4
86	15XX 734XX	-	9.4
87	15XX 736XX	-	9.9
88	15XX 736XX	-	2.9
89	15XX 738XX	-	8.6
90	16XX 913XX	-	2.7

91	22XX	-	6.5
92	43XX	-	10.9
93	49XX	-	14.2
94	58XX	-	25.8
95	60XX	-	42.6
96	60XX	-	8.1
97	63XX	-	30.3
98	73XX	-	7.3
99	73XX	-	1.1
100	73XX	-	0.9
101	91XX	-	3.6
102	15XX 303XX	-	-
103	15XX 280XX	-	-
104	15XX 021XX	-	-
105	15XX 021XX	-	-
106	15XX 718XX	-	-
107	15XX 529XX	-	-
108	15XX 470XX	-	-
109	15XX 734XX	-	-
110	156XX 607XX	-	-
111	15XX 88XX	-	-
112	15XX 207XX	-	-
113	15XX 470XX	-	-
114	15XX 529XX	-	-
115	15XX 528XX	-	-
116	15XX 608XX	-	-
117	15XX 101XX	-	-
118	15XX 248XX	-	-
119	15XX 144XX	-	-
120	15XX 216XX	-	-
121	15XX 443XX	-	-
122	15XX 017XX	-	-
123	15XX 864XX	-	-
124	15XX 490XX	-	-
125	15XX 203XX	-	-
126	15XX 528XX	-	-
127	15XX 756XX	-	-
128	15XX 607XX	-	-
129	15XX 448XX	-	-
130	15XX 420XX	-	-
131	15XX 206XX	-	-
132	46XX	-	14.8
133	23XX	-	7.4
134	43XX	-	6.7
135	46XX	-	16.9
136	29XX	-	13.8
137	46XX	-	5.4
138	29XX	-	18.5
139	43XX	-	6.5
140	40XX	-	22.6
141	46XX	-	8.0
142	46XX	-	5.6
143	47XX	-	10.1
144	23XX	-	6.4
145	22XX	-	8.9
146	22XX	-	33.5
147	46XX	-	7.9

148	46XX	-	4.3
149	46XX	-	0.8
150	05XX	-	5.1
151	40XX	-	11.4
152	46XX	-	6.2
153	05XX	-	3.0

○ 국내 사육 소의 감염실태 및 역학적 특성 조사 결과

경기도, 충청도, 강원도, 전라도, 경상도 등지에 분포한 총 153마리의 소에서 채취한 142개 분변 가검물, 119점의 혈청 가검물에 대한 요네병 검사결과의 지역 분포를 분석한결과 분변 가검물 및 혈청 가검물 모두 강원도에서 수집한 가검물에서 양성개체를 확인 하였다 (표 6).

표 6. 국내 사육 소 요네병 진단검사 지역 분포

	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
경기도	25	25
충청북도	27	19
충청남도	26	22
강원도	50 (양성 5)	50 (양성 3)
전라남도	11	-
경상남도	3	3

각 지역에서 수집한 분변 및 혈청가검물에 대한 소 요네병검사결과를 연령별로 분석한 결과 분변에서는 모두 약 2.5년 이상의 소에서 검출되었다 (표 7).

표 7. 국내 사육 소 요네병 진단검사 연령 분포

개월령	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
1 - 10	44	44
11 - 30	33	25
31 - 50	10 (양성 1)	10
51 - 70	30	15
71 - 90	15(양성 2)	15 (양성 2)
91 -	10 (양성 2)	10 (양성 1)

2. miRNA을 이용한 요네병 조기진단을 진단법 개발

소 요네병의 주요 감염원인 준임상형 분변배출 개체 (subclinical fecal shedder) 의 조기검출기법을 개발하기 위하여 혈청내 miRNA 분석을 실시하였다. 이를 위하여 본 연구실에서 2013년부터 실험시 (2019년)까지 요네병 진단을 위해 국내 농장으로부터 수집한 분변 (271개) 및 혈청 가검물 (298개)을

이용하여 fecal PCR 법, ELISA 법 및 임상증상등을 바탕으로 감염단계를 구분하였다. 감염단계는 4 group (A group: PCR, ELISA 양성, 임상증상있음, B group: PCR, ELISA 양성, 임상증상없음, C group: PCR양성, ELISA음성, 임상증상없음, D group: PCR, ELISA 및 임상증상 음성) 으로 구분하였고, 단계별 혈청 샘플들의 miRNA를 추출하여 음성그룹 대비 감염그룹의 miRNA 염기서열 분석을 통해서 차등발현되는 miRNA를 확인하였다. 이들중 음성 그룹 대비 모든 감염그룹에서 2배이상 ($|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$)차등발현된 miRNA를 발현값을 기준으로 하여 biomarker 후보들을 선별하였다.

요네병균의 감염된 소의 혈청들을 감염단계에 따라 혈청들을 분류하여 miRNA를 추출한 뒤, miRNA-sequencing 분석을 진행하여 차등발현되는 총 110개의 miRNA들을 확인하였다. 이들 miRNA 중 모든 감염그룹에서 일정하게 2배 이상 발현변화가 나타나는 8개의 biomarker 후보 유전자들을 선별하였다 (표 8). 이후 Real-time PCR을 통해 miRNA들의 실제 유전자 발현을 확인하여 모든 감염그룹에서 유의미한 발현 변화를 보인 4개의 biomarker 후보군 선정하였음 (bta-miR-374b, bta-miR2887, bta-miR-147, bta-miR-346).

표 8. 선정된 후보 miRNA들의 시퀀스 및 발현량

miRNA	miRNA sequence	Log2 fold change		
		Group A	Group B	Group C
bta-miR-363	ATTGCACGGTATCCATCTGCG	2.49	2.75	3.41
bta-miR-374b	ATATAATACAACCTGCTAAGTG	4.02	3.39	2.70
bta-miR-2887	CGGGACCGGGTCCGGTGCG	2.15	2.49	2.25
bta-miR-147	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA	-2.45	-3.32	-3.25
bta-miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	-3.45	-2.08	-2.43
bta-miR-346	TGTCTGCCCGCATGCCTGCCTCT	-5.10	-4.13	-2.23
bta-miR-655	ATAATACATGGTTAACCTCTCT	-2.54	-3.58	-3.41
bta-miR-2426	AAGGAAGTGGCTTGGGGAAAG	-4.16	-3.20	-2.98

이들 miRNA 유전방 발현의 상호관계를 분석하기 위하여 Ingenuity pathway analysis (IPA) tool을 이용하여 후보 miRNAs와 관련된 유전자들의 네트워크 분석을 진행하였다. 네트워크는 MAP 감염 초기 면역반응에 주를 이루는 TNF와 이와 관련된 여러 T helper 1 관련 분자들이 활성화되어 있었으며, 이뿐만 아니라 준임상기에서 임상기로의 전환되는 시기에 관여하는 regulatory T cell 및 이후 과정에서 주를 이루는 T helper 2 관련 분자인 TGFβ-1 및 IL-10 등도 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3).

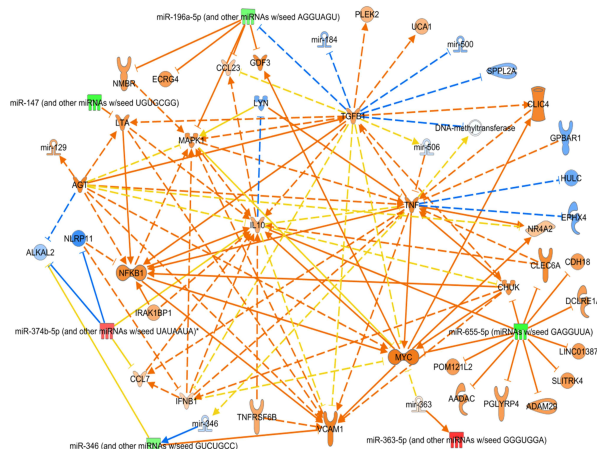


그림 3. MAP 감염 그룹의 공통발현 miRNAs로 형성된 네트워크

miRNA 발현 양상분석을 통해서 2개의 miRNAs (bta-miR-374b, bta-miR-2887)는 임상기 그룹 A에서 유의적으로 발현 증가하였으며, 2개의 miRNAs (bta-miR-147, bta-miR-346)은 임상증상이 나타나기전 그룹인 B, C에서 유의적 발현이 감소함 (그림 4).

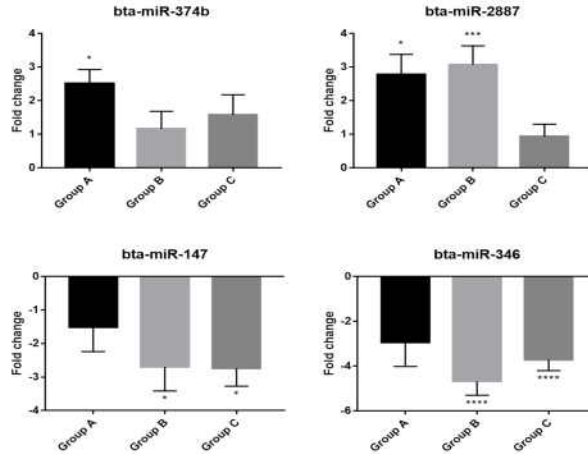


그림 4. 요네병 감염군의 후보 miRNA에 대한 유전자 발현량 확인

3. Microbiome 분석을 통한 요네병 잠복감염개체검출을 위한 진단법 개발

○ 요네병 미감염우, 동거우, 감염우 간 미생물 균총 분석

소 요네병군의 잠복개체를 효율적으로 검출하기 위한 예측모형을 개발하기 위하여 소 분변내 microbiome 분석을 실시하였다. 이를 바탕으로 기존연구결과를 종합하여 machine-learning 기법을 통하여 소 분변내 microbiome 의 분포의 분석으로 요네병 잠복감염개체를 검출하는기법을 개발하고자 하였다.

장내 균총 파이프라인을 구축하고 이를 업데이트하면서 미감염우와 감염우에 대한 기본적인 장내 균총 양상 파악을 진행하였음. 확보된 소 유래 분변 샘플로부터 16S rRNA 시퀀싱 데이터를 생성하여 분석에 활용하고자 하였으며, 유의미한 지표를 발굴하기 위해 MAP 감염에 민감하게 반응하는 주요 미생물들을 선별하는 과정과 ELISA s/p ratio나 fecal PCR 결과 등 기존의 진단 방식의 결과값을 통합하여 분석을 진행하였다.

즉, 샘플의 특성을 정리한 메타데이터 파일 생성, 장 내 균총 분석에 특화된 파이프라인을 활용한 미생물 군집 분석, 자체 제작한 알고리즘 등을 활용한 추가 분석의 단계로 진행되었음 (그림 5). 분석에 사용된 샘플은 총 52개 (감염우: 22, 동거우: 10, 미감염우: 20)로써 장 내 균총 분석용 파이프라인은 가장 널리 사용되며 정확성을 가지고 있다고 알려진 QIIME2를 활용하여 α -diverstiy, β -diversity, 그리고 생물군 분류 지정 (taxonomy assignment)을 진행함. 이후 추가적으로 미생물 분류 단위인 ASV (amplicon sequence variant)의 상대적 풍부도(relative abundance) 값을 활용한 다양한 추가 분석과 PICRUST2를 활용한 집단유전체 예측 등을 통해 특성을 파악하고자 하였다.

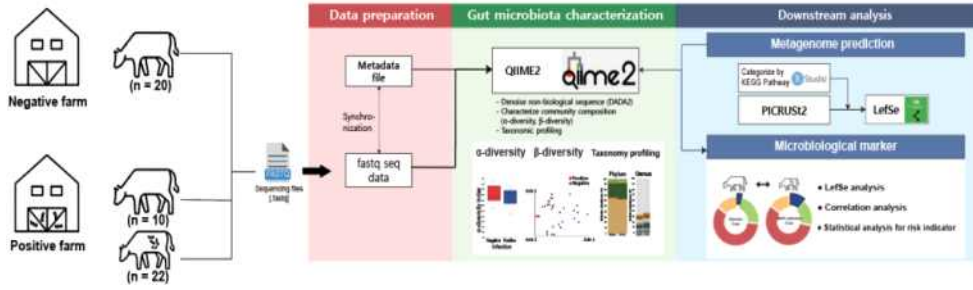


그림 5. 총 52개 샘플을 활용한 장내균총 분석 모식도

MAP 감염 유무, 감염우와의 동거 유무, ELISA 혹은 fecal PCR 결과 등 샘플 별 특성에 따라 아그룹화(subgrouping) 및 통계적 분석을 진행할 수 있도록 메타데이터를 생성하였다 (표 9). 동일 개체 인데 식별번호가 바뀐 경우에는 이를 혼동하지 않기 위해 1차 샘플링 시 식별번호에 2차 샘플링은 “.2”, 3차 샘플링은 “.3” 등으로 표기를 바꾸어 분석을 진행하였다.

표 9. 샘플 별 특성을 반영한 메타데이터

Sample ID	Infection result	Subgroup	ELISA s/p ratio	MAP_CFU (Fecal PCR)	Sampling	Farm	Lactation	Parity	Cow type	Age (yr)
23	Negative	Co-housing_negative	6.8	-	2021	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	6
28	Negative	Co-housing_negative	0.7	-	2021	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
33	Negative	Co-housing_negative	1.6	-	2021	PositiveFarm	Dry	3	Dairy	7
38	Negative	Co-housing_negative	7.9	-	2021	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	6
41	Negative	Co-housing_negative	1.9	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	6
42	Negative	Co-housing_negative	3.4	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	5
50	Negative	Co-housing_negative	4.6	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	5
61	Negative	Co-housing_negative	2.5	-	2021	PositiveFarm	Dry	1	Dairy	4
81	Negative	Co-housing_negative	2.5	-	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	4
8221	Negative	Co-housing_negative	5.1	-	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
neg_123	Negative	Negative-farm	3.952976	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	3	Dairy	5
neg_157	Negative	Negative-farm	5.775165	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_196	Negative	Negative-farm	6.127847	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_198	Negative	Negative-farm	8.875827	-	2019	NegativeFarm	Gestation	1	Dairy	4
neg_226	Negative	Negative-farm	1.932403	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Dairy	3
neg_228	Negative	Negative-farm	6.436444	-	2019	NegativeFarm	Gestation	1	Dairy	3
neg_229	Negative	Negative-farm	4.188097	-	2019	NegativeFarm	Gestation-miscarriage	1	Dairy	3
neg_23	Negative	Negative-farm	10.76414	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	4	Dairy	3
neg_38	Negative	Negative-farm	2.902278	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	5
neg_81	Negative	Negative-farm	4.665687	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_K10	Negative	Negative-farm	9.448935	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	3	Hanwoo	5
neg_K15	Negative	Negative-farm	44.14401	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K19	Negative	Negative-farm	8.412932	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	0	Hanwoo	3
neg_K25	Negative	Negative-farm	7.435709	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K28	Negative	Negative-farm	2.828802	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	3
neg_K29	Negative	Negative-farm	4.35709	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K31	Negative	Negative-farm	6.252755	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K33	Negative	Negative-farm	5.892726	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	2
neg_K34	Negative	Negative-farm	3.357825	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	2

neg_K8	Negative	Negative-farm	3.196179	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	4	Hanwoo	5
134	Positive	Positive	57.5	2.46E+07	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	8
167	Positive	Positive	76.4	-	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
167.2	Positive	Positive	40.6	-	2020	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
167.3	Positive	Positive	51.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	8
168	Positive	Positive	7.6	8.03E+00	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
168.2	Positive	Positive	115.4	-	2020	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
181	Positive	Positive	148.5	-	2020	PositiveFarm	Dry	4	Dairy	7
181.2	Positive	Positive	20	-	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	3
181.3	Positive	Positive	138.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	5	Dairy	8
188	Positive	Positive	175.9	1.01E+05	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	5
188.2	Positive	Positive	2.7	-	2020	PositiveFarm	Dry	4	Dairy	6
202	Positive	Positive	93.4	1.10E+03	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	4
202.2	Positive	Positive	163.3	-	2020	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	5
224	Positive	Positive	2.4	4.95E+02	2019	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	5
237	Positive	Positive	3.4	5.72E+02	2019	PositiveFarm	Dry	1	Dairy	3
32	Positive	Positive	3.1	4.09E+03	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	6
35	Positive	Positive	75.7	6.71E+04	2021	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
58	Positive	Positive	154.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	4
68	Positive	Positive	10	1.14E+02	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
79	Positive	Positive	0	6.46E+03	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
8219	Positive	Positive	0.1	6.74E+03	2019	PositiveFarm	Lactation	5	Dairy	8
97	Positive	Positive	1.2	1.86E+02	2019	PositiveFarm	Dry	5	Dairy	8

가장 우선적으로 MAP 감염 유무에 따른 α -diversity, β -diversity 지표들의 변화를 통해 장내 균총 변화양상을 확인해봄. 먼저 α -diversity는 미생물 군집의 균등도(evenness), 풍부도(richness), 그리고 다양성 (diversity)을 나타내는 여러 지표들을 통해 군집 내 개체 별 특성을 파악하였다 (그림 6). 흥미롭게도, 살펴본 5가지 지표 모두 MAP 감염군이 유의적으로 더 낮은 것을 확인하였다. 일반적으로 3가지 항목이 모두 높을수록 건강한 장내균총이라고 여겨지기 때문에 MAP 감염이 소의 장내 균총에 악영향을 주었다는 것을 알 수 있었다.

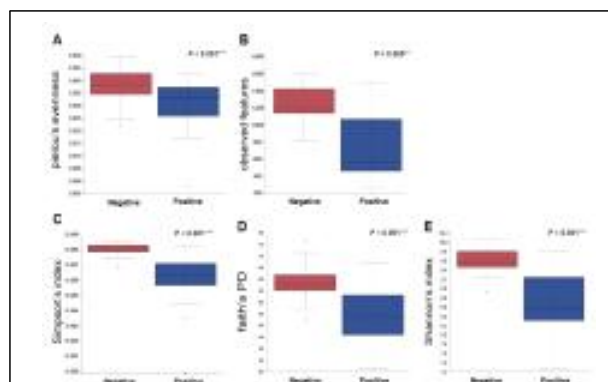


그림 6. MAP 감염 유무에 따른 α -diversity 지표의 변화 (A) Pielou's evenness (균등도), (B) observed features (풍부도), (C-E) Simpson's index, faith's PD, Shannon's index (이상 다양성)

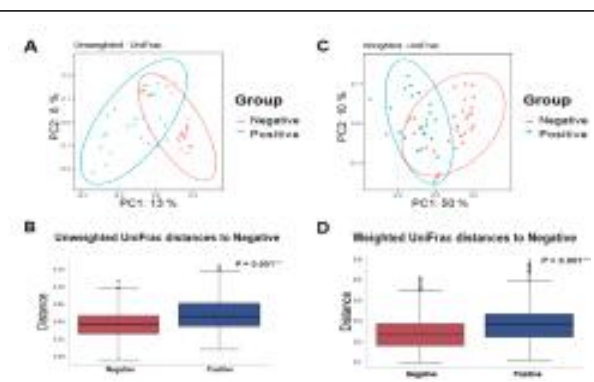


그림 7. MAP 감염 유무에 따른 β -diversity 지표의 변화 (A-B) 비가중 균간 유사거리 기반 PCoA plot (A)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (B), (C-D) 가중 균간 유사거리 기반 PCoA plot (C)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (D)

다음으로는, 샘플 간 차이를 확인하기 위해 β -diversity 지표 중 비-/가중 균간 유사거리 (un-/weighted UniFrac distance)를 이용한 PCoA (principal coordinates analysis) plot을 그려 시각화하였다 (그림 7). 이 때 그룹 간 차이 확인이 용이하도록 감염군 (Positive, 파랑) 과 대조군 (Negative, 빨강)의 색깔을 다르게 라벨링하였고, 95% 신뢰타원을 표시함 (그림 7A). 또한 대조군의 중심점(centroid)으로부터 각 샘플의 거리를 상자 그래프화하고 그 통계적 유의성(Mann-Whitney U test)을 파악하였음 (그림 7B). 결과적으로, 두 가지 지표 모두 PCoA plot에서도 그룹에 따라 군집화(clustering)이 일어나며 통계적으로도 유의적인 차이가 있었다. 즉, MAP 감염이 장내 균총의 변화를 명백하게 유도하였다는 것을 뜻함.

MAP 감염이 개별 미생물에 미치는 미시적 영향을 파악하기 위해 각 미생물의 상대적 풍부도 값 정보를 기반으로 통계 분석 등을 진행하여 각 그룹에서 유의적으로 풍부한 미생물들 (감염군: 파랑, 대조군: 빨강)을 파악할 수 있었다 (그림 8). 또한, 각각의 값들은 ELISA s/p ratio 및 fecal PCR 결과와의 상관관계 분석, MAP 감염에 민감하게 반응하는 미생물을 선별하는 feature로서 활용하는 등 최종적인 지표 개발에 적극 활용할수 있을것으로 판단하였다.

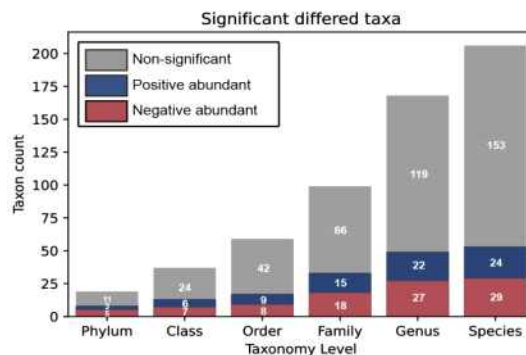


그림 8. 생물군 수준별 유의미한 변화가 확인된 미생물 분포

※ 3차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

국내 사육 소 농장에서 요네병을 검색하기 위해 188개 소 분변과 165점의 혈청을 수집하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 분변 및 혈청가검물은 1, 2년차와 동일한 방법으로 검사를 수행하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP 의 분리, 동정을 실시하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

3년차 소 요네병 검사를 위하여 총 188두의 소로부터 분변 (188개) 과 혈청 (165개)을 채취하여 요네병에 대한 진단검사를 실한 결과 분변에서 9두 (4.8%), 혈청에서 5두 (3.0%)가 양성을 보였다 (표 10). 분변에서 양성을 보인 개체에서는 1, 2년차에서 시행한것과 같은 방법으로 MAP 의 분리, 동정을 실시하였다.

표 10. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=188)	
	분변 (n=188)	혈청 (n=165)
양성	9	5
음성	179	160

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 11 과 같다.

표 11. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	20XX	-	4.6
2	80XX	양성	양성 (71.4)
3	10XX	양성	10.8
4	76XX	-	10.0
5	81XX	-	8.5
6	24XX	-	3.8
7	30XX	-	3.5
8	30XX	-	2.9
9	30XX	-	5.9
10	80XX	-	3.3
11	49XX	-	1.6
12	07XX	-	3.4
13	06XX	-	5.4
14	16XX	-	1.2
15	130XX	-	4.9
16	F16XX	-	1.4
17	J16XX	-	2.6
18	F16XX	-	1.4
19	160XX	-	3.2
20	161XX	-	7.1
21	130XX	양성	2.8
22	J16XX	-	1.0
23	F16XX	-	4.2
24	160XX	-	3.6
25	160XX	-	20.9
26	34XX	-	20.1
27	25XX	-	2.0
28	83XX	-	1.9
29	14XX	-	1.9
30	45XX	-	3.2
31	39XX	-	4.5
32	53XX	-	1.8
33	49XX	-	2.0
34	91XX	-	1.4
35	80XX	-	3.8
36	04XX	-	7.7
37	02XX	-	2.6
38	20XX	-	1.8
39	20XX	-	4.7
40	06XX	-	3.0
41	12XX	-	20.9
42	24XX	-	2.28
43	29XX	-	2.4

44	98XX	-	1.2
45	33XX	-	3.7
46	41XX	-	20.1
47	43XX	-	2.5
48	59XX	-	1.8
49	67XX	-	6.4
50	92XX	-	9.1
51	SFXX	양성	1.3
52	160XX	-	-
53	170XX	-	-
54	160XX	-	-
55	180XX	-	-
56	170XX	-	-
57	170XX	-	-
58	F16XX	-	-
59	170XX	-	-
60	170XX	-	-
61	F16XX	-	-
62	170XX	-	-
63	J17XX	-	-
64	160XX	-	-
65	130XX	-	-
66	F16XX	-	-
67	210XX	-	-
68	160XX	-	-
69	180XX	-	-
70	F16XX	-	-
71	180XX	-	-
72	170XX	-	-
73	140XX	-	-
74	160XX	-	-
75	170XX	-	1.8
76	210XX	-	1.2
77	160XX	-	7.1
78	160XX	-	6.4
79	J17XX	-	3.8
80	170XX	-	2.4
81	170XX	-	1.2
82	180XX	-	7.1
83	160XX	-	8.5
84	160XX	-	3.7
85	36XX	-	2.7
86	36XX	-	16.9
87	25XX	-	3.1
88	39XX	-	4.0
89	27XX	-	1.6
90	97XX	-	6.4
91	66XX	-	3.0
92	44XX	-	1.4
93	44XX	-	15.0
94	13XX	-	4.5
95	32XX	-	0.8
96	53XX	-	6.4
97	68XX	-	1.3
98	41XX	-	23.3
99	88XX	양성	1.8
100	44XX	-	2.0

101	43XX	-	2.6
102	31XX	-	1.5
103	59XX	-	0.8
104	09XX	-	7.5
105	29XX	-	10.2
106	70XX	-	15.0
107	71XX	-	8.4
108	13XX	-	1.5
109	31XX	-	0.1
110	41XX	-	4.3
111	43XX	-	0.4
112	44XX	-	0.1
113	53XX	-	18.3
114	59XX	-	6.6
115	68XX	-	0.1
116	39XX	-	1.1
117	39XX	-	1.9
118	93XX	-	1.3
119	43XX	-	1.1
120	43XX	-	0.7
121	43XX	-	1.2
122	93XX	-	1.0
123	95XX	-	1.9
124	40XX	-	1.6
125	93XX	-	17.1
126	40XX	-	2.8
127	37XX	-	1.9
128	95XX	-	8.3
129	95XX	-	0.9
130	39XX	-	4.5
131	42XX	-	2.4
132	43XX	-	3.6
133	43XX	-	2.4
134	93XX	-	9.2
135	42XX	-	3.8
136	43XX	-	1.0
137	95XX	-	1.6
138	95XX	-	1.5
139	39XX	-	2.5
140	43XX	-	3.4
141	43XX	-	4.2
142	39XX	-	0.9
143	40XX	-	2.9
144	43XX	-	5.1
145	42XX	-	2.3
146	13XX	-	2.7
147	31XX	-	0.8
148	41XX	-	6.0
149	43XX	-	0.7
150	44XX	-	1.1
151	44XX	-	11.0
152	53XX	-	4.4
153	59XX	-	0.5
154	68XX	-	1.3
155	SFXX	양성	양성 (148.6)
156	F16XX	-	35.2
157	210XX	-	37.8

158	160XX	양성	양성 (57.3)
159	210XX	-	28.8
160	140XX	-	27.3
161	210XX	-	5.0
162	210XX	-	2.7
163	21XX	-	1.6
164	16XX	-	5.1
165	140XX	-	6.4
166	210XX	-	3.7
167	F16XX	-	7.2
168	09XX	-	1.6
169	10XX	-	1.6
170	10XX	-	3.7
171	21XX	-	1.3
172	32XX	-	2.2
173	34XX	-	1.6
174	38XX	-	1.5
175	54XX	-	1.7
176	55XX	-	1.5
177	89XX	-	1.8
178	99XX	-	2.8
179	SFXX	양성	양성 (154.7)
180	SF1XX	양성	양성 (145.9)
181	09XX	-	1.6
182	10XX	-	1.6
183	10XX	-	3.7
184	21XX	-	1.3
185	32XX	-	2.2
186	34XX	-	1.6
187	38XX	-	1.5
188	54XX	-	1.7

2. Microbiome 분석을 통한 요네병 잠복감염개체검출을 위한 진단법 개발 - 2년차 계속

○ MAP 감염 민감성 미생물 선별 및 미생물학적 감염 지표 개발

MAP 감염에 민감하게 반응하는 미생물을 파악하기 위해서, 미생물의 상대적 풍부도값을 활용하여 그룹을 선정하여 LDA 분석(cut-off: \log_{10} [LDA score] > 2)을 진행하였다. 첫 번째로는 두 그룹 간 비교 (양성농장 내 MAP 감염군과 대조군)를 하였고, 또한 농장 간 사료 조성, 개체 관리 방법 등의 차이를 배제하기 위해서 세 그룹 간 비교 [양성농장 MAP 감염군 (Positive, 파랑); 양성농장 미감염 동거우군 (Co-housing negative, 초록); 음성농장 미감염군 (Negative, 빨강)]로 나누어 분석하였다. 두 그룹 간 유의적인 비교를 미생물군 수준별 계층 정보와 함께 반영한 분지도 (cladogram)을 통해 동일 환경에서 거주하는 개체들 간 MAP 감염 여부에 따른 미생물 분포 변화를 확인할 수 있었음 (그림). 또한 음성농장의 개체들을 포함한 세 그룹 간 비교를 통해서는 농장 간 차이를 반영한 미생물 분포 변화를 확인하였다 (그림 9) 이로서, 두 가지 분석 결과를 종합하여 좀 더 정확한 MAP 감염 특이적 미생물들을 도출해낼 수 있었다. 그 결과, MAP 감염군에서 특이적으로 많이 분포하는 *Clostridium difficile* 등 그룹 간 구별에 크게 관여하는 복수의 미생물들을 확인할 수 있었다.

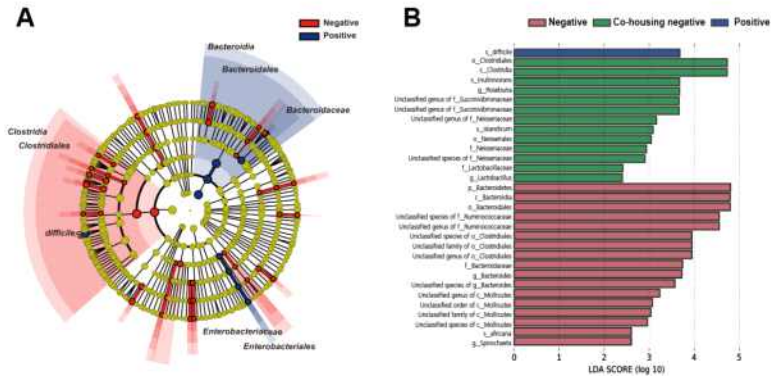


그림 9. MAP감염우, 동거우, 미감염우의 그룹 특이적 미생물 확인.

(A) 양성농장 내 감염군과 대조군 간 비교, (B) MAP감염우, 동거우, 미감염우 간 비교 (막대 그래프)
 MAP 감염과 연관있는 미생물들을 LDA 분석과는 독립적인 방식으로 확인하기 위해서, 각 개체 별 ELISA S/P ratio 및 fecal PCR 결과값들과 미생물 풍부도값 간에 상관관계 분석 (Spearman correlation analysis)을 진행하였다. 이를 바탕으로 ELISA S/P ratio의 경우 상관관계를 가지는 미생물들이 선정하였다 (표 12).

표 12. ELISA S/P ratio 값과 상관관계를 보이는 미생물 분류군

Taxonomy (Total num)	Type	Bacteria	Coefficient (ρ)	P
Phylum (19)	Positive-correlated	Firmicutes	0.723	1.38E-09
		Actinobacteria	0.717	2.25E-09
		Euryarchaeota	0.636	3.96E-07
	Negative-correlated	Bacteroidetes	-0.638	3.68E-07
		Unassigned phylum of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Class (37)	Positive-correlated	Bacilli	0.8	1.12E-12
		Actinobacteria	0.681	2.78E-08
		Coriobacteriia	0.664	8.25E-08
		Methanobacteria	0.658	1.14E-07
		Clostridia	0.656	1.31E-07
		Gammaproteobacteria	0.549	2.50E-05
	Negative-correlated	Bacteroidia	-0.636	4.08E-07
		Unassigned class of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Order (59)	Positive-correlated	Bacillales	0.777	1.26E-11
		Bifidobacteriales	0.708	4.47E-09
		Coriobacteriales	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriales	0.658	1.14E-07
		Clostridiales	0.651	1.78E-07
		Aeromonadales	0.571	9.74E-06
		Lactobacillales	0.52	7.67E-05
	Negative-correlated	Bacteroidales	-0.636	4.08E-07
		Unassigned order of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Family (99)	Positive-correlated	Peptostreptococcaceae	0.838	9.62E-15
		Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridiaceae	0.781	8.82E-12
		Bifidobacteriaceae	0.708	4.47E-09

		Paraprevotellaceae	0.67	5.66E-08
		Coriobacteriaceae	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriaceae	0.658	1.14E-07
		Lachnospiraceae	0.633	4.78E-07
		Succinivibrionaceae	0.571	9.74E-06
		Unassigned family of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcaceae	0.522	7.12E-05
	Negative-correlated	Ruminococcaceae	-0.729	8.81E-10
		Unassigned family of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned family of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Rikenellaceae	-0.649	1.92E-07
		Unassigned family of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
		Unassigned family of Bacteria	-0.608	1.75E-06
		Bacteroidaceae	-0.534	4.53E-05
S24.7	-0.519	8.04E-05		
Genus (168)	Positive-correlated	Unassigned genus of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		[Clostridium](putative)	0.828	3.48E-14
		Clostridium (Peptostreptococcaceae)	0.811	3.30E-13
		Clostridium (Clostridiaceae)	0.781	8.82E-12
		Ruminococcus	0.759	6.89E-11
		Enterococcus	0.706	5.05E-09
		CF231	0.698	8.95E-09
		Methanobrevibacter	0.611	1.52E-06
		Unassigned genus of Veillonellaceae	0.597	2.97E-06
		Succinivibrio	0.585	5.22E-06
		Methanosphaera	0.577	7.40E-06
		Unassigned genus of Lachnospiraceae	0.546	2.78E-05
		Unassigned genus of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcus	0.522	7.12E-05
	Unassigned genus of Bifidobacteriaceae	0.502	1.51E-04	
	Negative-correlated	Unassigned genus of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.683	2.38E-08
		Unassigned genus of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Alistipes	-0.657	1.21E-07
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.618	1.08E-06
		Unassigned genus of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
		Unassigned genus of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Bacteroides		-0.566	1.23E-05	
gut		-0.563	1.37E-05	
Oscillospira		-0.551	2.30E-05	
Unassigned genus of S24.7	-0.519	8.04E-05		
Species (206)	Positive-correlated	Unassigned species of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridium ruminantium	0.814	2.15E-13
		Unassigned species of Clostridium	0.804	7.20E-13
		Clostridium disporicum	0.797	1.62E-12
		Ruminococcus lactaris	0.755	1.03E-10
		Clostridium difficile	0.75	1.61E-10

		Unassigned species of Clostridium	0.719	1.89E-09
		Enterococcus casseliflavus	0.706	5.05E-09
		Unassigned species of CF231	0.698	8.95E-09
		Clostridium paraputrificum	0.634	4.60E-07
		Unassigned species of Methanobrevibacter	0.601	2.49E-06
		Unassigned species of Veillonellaceae	0.597	2.97E-06
		Unassigned species of Succinivibrio	0.585	5.22E-06
		Unassigned species of Methanosphaera	0.577	7.40E-06
		Unassigned species of Lachnospiraceae	0.546	2.78E-05
		Unassigned species of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcus equi	0.522	7.12E-05
		Unassigned species of Bifidobacteriaceae	0.502	1.51E-04
		Negative-correlated	Unassigned species of Bacteroidales	-0.696
	Unassigned species of Ruminococcaceae		-0.683	2.38E-08
	Unassigned species of Bacillales		-0.675	3.97E-08
	Unassigned species of Clostridium		-0.629	5.93E-07
	Unassigned species of Ruminococcaceae		-0.618	1.08E-06
	Unassigned species of Clostridiales		-0.617	1.13E-06
	Unassigned species of Alistipes		-0.616	1.17E-06
	Unassigned species of Bacteria		-0.608	1.75E-06
	Bacteroides nordii		-0.568	1.11E-05
	gut metagenome		-0.563	1.37E-05
	Oscillospira guilliermondii		-0.551	2.30E-05
	Alistipes finegoldii		-0.531	5.11E-05
	Unassigned species of S24.7	-0.519	8.04E-05	
Spirochaeta africana	-0.505	1.36E-04		

위에서 언급된 세 가지 결과 (그룹 간 미생물 상대적 풍부도의 통계적 분석, LDA 분석, 그리고 상관관계 분석)를 바탕으로 공통적으로 MAP 감염에 특이적 반응을 보이는 미생물을 수동으로 선별하는 과정을 거쳐 선별의 목적이 감염 지표 도출이었기에 선별에 사용한 기준은 각 분류군 수준에서 미지정된 (unassigned) 미생물은 제외하고, 감염군과 대조군에서 각각 한 번 이상 영 값 (zero value)이 나오는 경우는 제외하였다. 선별된 미생물들은 생물 분류군 수준별로 MAP 감염 시 그 분포가 증가하는 미생물과 감소하는 미생물을 짝지어 비율값으로 변환한 뒤, 그룹 간 통계적 유의차를 확인하였음. 결과적으로 문(Phylum, *Firmicutes* to *Bacteroidetes*), 강(Class, *Clostridia* to *Bacteroidia*), 목(Order, *Clostridiales* to *Bacteroidiales*, *Enterobacteriales* to *Clostridiales*), 과(Family, *Enterobacteriaceae* to *Ruminococcaceae*) 수준에서 총 5개의 예비 감염 지표를 선정할 수 있었다 (그림 10).

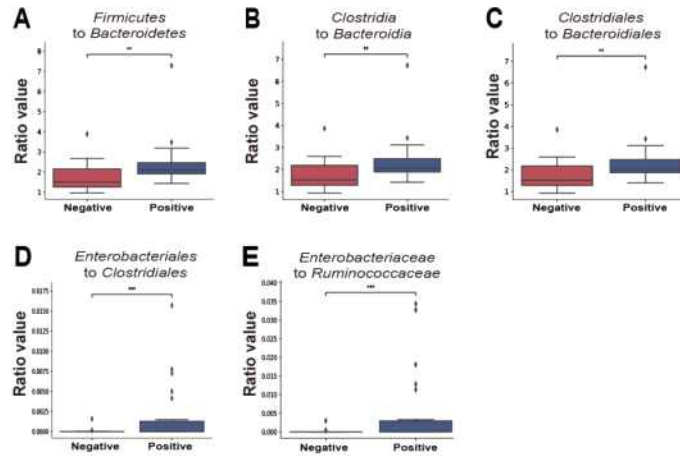


그림 10. 생물군 분류 수준별 잠재적인 MAP 감염 지표 5종
(A) 문 수준 (B) 강 수준 (C-D) 목 수준 (E) 과 수준

문 수준에서 종 수준까지의 미생물 분류군 588개를 나열한 다차원의 데이터 행렬을 생성한 후 분류 성능을 저해시킬 수 있는 값이 거의 일정한 (quasi-/constant value) feature를 제거하였고, 이를 통해 110개의 feature가 제거되었고 이후 과정에서는 478개의 feature만을 이용하여 분류모델을 만드는데 사용하였다. 제거 전 (Before)과 후(After)의 데이터 행렬을 2차원으로 차원 축소를 하여 지도학습의 일종인 LDA, 비지도학습의 일종인 PCA (principal component analysis)를 이용하여 데이터의 보존 정도를 확인해본 결과 매우 유사하게 시각화가 되는 것을 확인하였다 (그림 11). 또한 정량화 수치인 silhouette score (Before: 0.611358, After: 0.640311)과 calinski score (Before: 128.823863, After: 129.55748)가 거의 유사한 것을 통해서 제거 전후의 데이터 특성이 거의 동일함을 확인하여 이후 feature 선별에는 478개의 feature들만을 사용하였다.

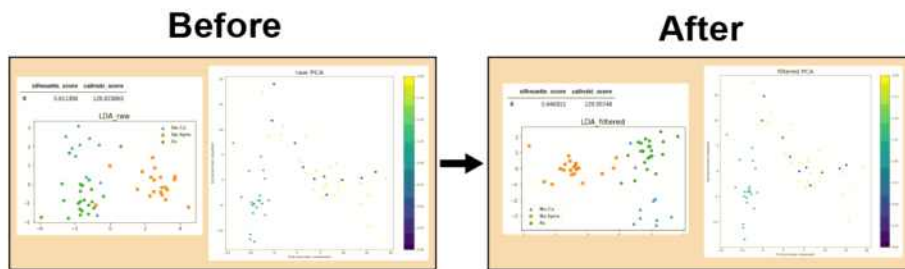


그림 11. 상수 값 제거 전(Before)과 후(After)의 LDA와 PCA plot 및 정량화 수치
(silhouette score, calinski score)

이후 분류 문제 (classification)에 대한 모델 생성시 과적합(overfitting)을 방지하고자 자주 사용하는 정규화 (regularization) 회귀 방식인 Ridge, LASSO, ElasticNet 회귀방식과 함께 최근 널리 사용되고 있는 Feature Selector, Filter Method 방식까지 총 5가지 방법을 통해서 주요 feature를 선별하고 기존 데이터를 얼마나 보존하고 있는지를 확인하였다. 이 때 기존 미생물 상대적 풍부도 값 자체를 사용하는 것 (이하 Raw data) 외에도 분류 성능 증진을 목적으로 데이터 간 분산을 증가시키고자 기존 값에 1.5 거듭제곱을 해주는 거듭제곱 변환 (1.5 power transformation, 이하 1.5 power)과 자연 상수 e를 밑으로 하고 기존 값을 지수로 한 거듭제곱 변환 (exponential transformation, 이하 exp)을 한 값을 이용해서 분석을 진행하였다.

세 가지 데이터에서 공통적으로 Feature Selector가 가장 적은 feature 개수를 선별하였고,

전체 데이터 대비 95% 가량을 표현할 수 있었다 (cumulative importance = 0.95). 따라서, MAP에 민감하게 반응하는 미생물 집단을 선별해내어 감염 분류 모델을 만드는 데는 Feature Selector를 통해서 진행하기로 결정하였다. 이어서 파라미터 최적화 과정(missing threshold=0.6, correlation threshold=0.98, task=classification, eval_metric=auc, cumulative importance=0.95)을 통해 최종 모델 설계 및 그 성능을 평가하는 과정을 진행하였다. 각각의 데이터 종류 별로 뽑힌 feature의 갯수는 Raw data 조건 10개, exp 조건 13개, 그리고 1.5 power 조건 14개였으며, 뽑힌 feature들의 종류와 그 중요도를 확인해보았다 (그림 12). 모든 경우에서 가장 중요한 feature로 선별된 미생물은 앞서 LDA분석시 MAP감염군 특이적으로 분포가 증가한 것으로 확인되었던 *Clostridium difficile* 이었으며, 그 외에 앞서서 예비 감염 지표 선정에 활용되었던 *Bacilli* 등도 일관되게 선별되었다.

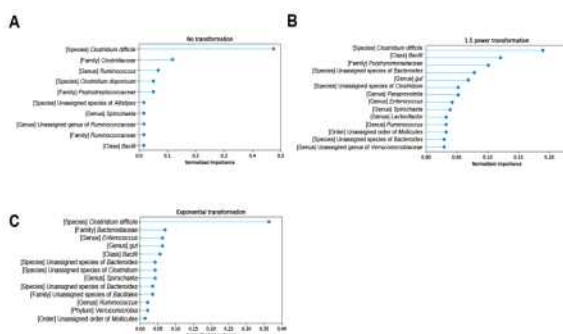


그림 12. 데이터 종류별 선별된 feature들의 중요도 평가 (A) Raw data (B) 1.5 power (C) exp

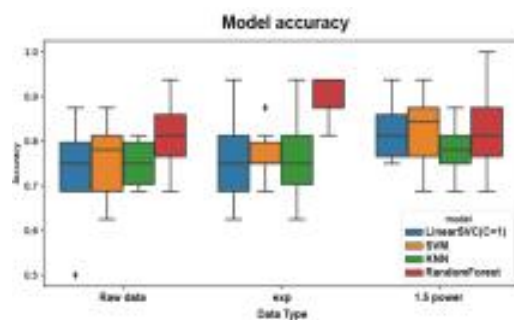


그림 13. 4가지 학습 알고리즘에 따른 각 데이터 종류별 모델 정확도 평가

MAP 감염 분류 모델은 선별된 feature들에 대한 현재의 52개 샘플 데이터를 이전 과정과 동일하게 raw data, 1.5 power, exp 형태로 준비하고, 각각의 사례별로 train set과 test set 7:3의 비율로 나누어서 전자는 모델 학습에 이용하고 후자는 성능 평가에 활용하는 방식으로 제작하였다. 일반적인 기계학습에 비해 상대적으로 적은 샘플의 개수인 상황을 고려하면서 편향된 검증 (biased validation)을 방지하기 위해서 무작위로 train과 test set을 선별하는 과정을 10회 독립 시행한 뒤 그 accuracy 등을 파악하여 모델의 성능을 평가하였음. 모델의 학습 알고리즘은 support vector machine (linearSVC, SVM), k-nearest neighborhood (KNN), random forest를 활용하였다. 그 결과, 전반적으로 random forest 알고리즘을 이용하였을 때 정확도의 평균값이 0.8 ~ 0.9로 준수한 성능을 보여주었으며 특히 exp 데이터를 활용한 경우 정확도의 평균값 (0.8875)이 최고치를 기록하였다 (그림 13).

추가적으로 진단 결과를 포함하였을 때, 모델의 분류 성능이 증가하는지를 보기 위해서, ELISA s/p ratio값과 fecal PCR 기반 MAP cfu count 값을 각각 추가하거나 혹은 함께 (both) 모델에 학습시켰을 때 예측 정확도를 확인하였다. 그 결과 전반적으로 진단검사 지표가 추가되었을 경우 ELISA 결과(그림 14A), PCR 결과 (그림 14B)가 활용된 사례 모두 기존 모델 대비 분류의 성능이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 가장 높게 나온 조건은 2가지 진단 검사 결과를 모두 포함 (그림 14C)하고 미생물 상대적 풍부도 데이터 종류는 exp 데이터를 활용하여 random forest 알고리즘을 활용한 경우 (0.9125)였음. 이를 종합적으로 고려해보았을 때, Feature Selector를 이용해 선별된 십 수 개의 미생물들의 상대적 풍부도 값을 자연상수를 밑으로 하는 지수변환 값만으로도 정확도 기준 0.8~0.9 수준의 높은 예측 모델을 만들 수 있다는 것을 확인하였고, 여기에 진단 검사 결과를 함께 반영한다면 더욱 그 성능을 높힐 수 있어서 보다 정확한 진단이 가능해질 수 있다고 판단된다.

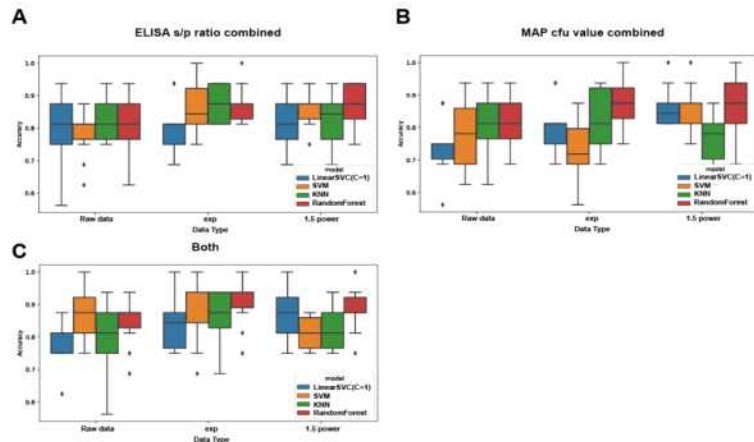


그림 14. ELISA, PCR 진단검사 결과를 학습 데이터로 추가하였을 때 모델 정확도 평가
 (A) ELISA 결과 추가 조건 (B) PCR 결과 추가 조건 (C) 모두 추가 조건

요약하면, MAP 감염을 식별할 수 있는 미생물학적 바이오마커를 발굴하기 위해 총 52개의 분변샘플을 양성농장 감염우, 양성농장 내 미감염 동거우, 음성농장 미감염우로부터 샘플링하여 각각의 장내균총 분포를 확인하였고, 감염 유무 등으로 그룹을 나누어 미생물 군집 다양성 분석 등을 통한 거시적 변화와 통계적으로 유의미한 상대적 풍부도값 변화 미생물들을 확인하였다. 그 결과, MAP 감염군의 장내균총 내 풍부도, 균등도, 다양성 등이 전반적으로 감소함으로써 미감염우에 비해 확인한 장내균총의 변화와 그에 따른 장 내 균총유래의 집단 유전체 활성 대사도 바뀔 수 있음을 확인함. 또한, 통계적 유의미성을 기준으로 미생물들을 일부 선정하였고 다양한 생물 분류군 수준에서 MAP 감염의 지표로 활용할만한 비율값 5종을 제안하였음. 이외에도 보다 정확한 바이오마커를 발굴하기 위해서 실험자의 주관이 들어가지 않고 고차원의 데이터 내에서 주요한 feature를 선별해주는 다수의 알고리즘을 장내균총 데이터에 활용하여 결과적으로 *Clostridium difficile*, *Bacilli* 등의 십 수 개의 미생물 분류군을 선별해낼 수 있었다. 또한 이들 미생물들의 상대적 풍부도 값과 함께 ELISA, PCR 검사 결과를 함께 활용함으로써 보다 우수한 성능의 분류모델을 만들 수 있음도 확인였고, 이번 연구에서 선별된 주요 미생물들의 상대적 풍부도값을 확인한다면, 기존 진단 방법들과 병용함으로써 보다 신속하고 정확한 진단이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 내용들은 MAP 감염 예측 모델에 대한 ROC curve작성 및 AUC 를 계산하였고 (그림 15) 이에 대한 각 예측모델별 performance metrics를 분류하였다 (표 13).

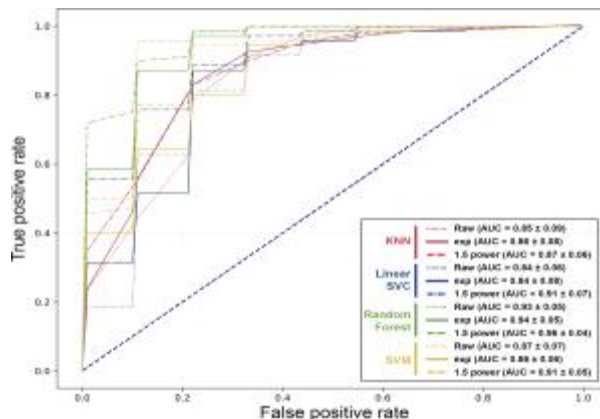


그림 15. ROC curves and AUC for MAP infection-predictive models.

표 13. MAP감염 예측 mode 에 대한 performance metrics 분류

Algorithm	Data set	Precision	Recall	F1 score	AUC
KNN ($k=3$)	Raw	0.81±0.11	0.79±0.11	0.79±0.11	0.86±0.09
	1.5 power	0.80±0.06	0.78±0.05	0.77±0.06	0.87±0.06
	Exp	0.83±0.11	0.82±0.11	0.82±0.11	0.86±0.08
LinearSVC	Raw	0.76±0.11	0.75±0.10	0.75±0.10	0.84±0.06
	1.5 power	0.86±0.09	0.84±0.09	0.84±0.09	0.91±0.07
	Exp	0.78±0.06	0.76±0.07	0.75±0.07	0.84±0.08
Random forest	Raw	0.90±0.07	0.89±0.08	0.89±0.08	0.93±0.05
	1.5 power	0.88±0.05	0.84±0.08	0.84±0.08	0.96±0.04
	Exp	0.88±0.07	0.86±0.07	0.85±0.08	0.94±0.05
SVM	Raw	0.80±0.09	0.77±0.08	0.77±0.08	0.87±0.07
	1.5 power	0.82±0.07	0.80±0.08	0.79±0.09	0.91±0.05
	Exp	0.80±0.04	0.79±0.04	0.79±0.05	0.86±0.06

3. MAP 돌연변이 주 (mutant) 제작 및 특성 분석을 통한 신규 병원성 인자 규명

본 연구실의 선행연구결과 및 타 연구자들의 선행연구결과를 바탕으로 MAP 병원성과 밀접한 관련성을 가질 것으로 예측되는 13개의 유전자를 선정하여 분류하였으며, 선정된 유전자들 중 4개 유전자를 (표 14) 선택하여 발현억제 돌연변이 작성을 위한 primer를 제작하였고,

표 14. CRISPRi mutant 제작을 위한 MAP의 병원성 관련 유전자 선정

Gene name	Function	Feature
Mdh (Malate Dehydrogenase)	Catalyzes the interconversion between malate and oxaloacetate	Expressed under stress conditions and activating dendritic cells
Hypothetical protein (Putative Nucleic Acid-Binding Protein)	DNA-binding protein	Th1 response induction and dendritic cell activation
PknG (Protein Kinase G)	Inhibition of phagosome-lysosome fusion	Induce IFN- γ production in sub-clinical infected individuals
Icl (Isocitrate Lyase)	Catalyze the conversion between isocitrate and glyoxylate	Important for intracellular survival in <i>M. tuberculosis</i>

이들 유전자에 대하여 primer와 plasmid 를 이용하여 construct 를 제작하였고, 이를 *E. coli* 에 cloning 한후, 재정제하여 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 competent cell 에 electrophoration 한후 37°C에서 4~6주 배양하여 돌연변이체를 작성하였다. 이들 돌연변이체는 PCR 검사를 통하여 확인하였다 (그림 16)

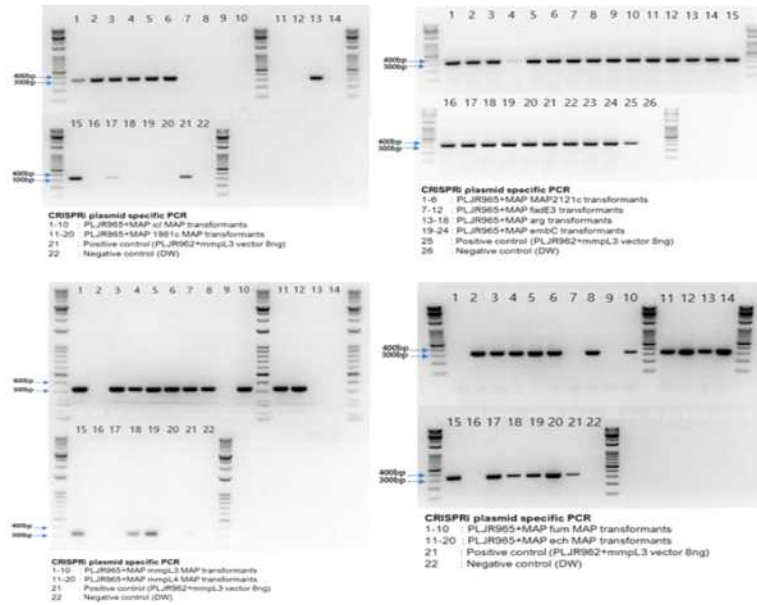


그림 16. 제작된 MAP mutant에서 CRISPRi plasmid의 확인

제작된 13종의 MAP mutant를 OD₆₀₀=0.5 정도까지 배양한 후 CRISPRi의 유도물질인 anhydrotetracycline (ATC)이 첨가된 7H10 agar와 첨가되지 않은 7H10 agar에 각각 일정 희석배수로 희석하여 접종 후 배양한후, 4주 동안 배양한 뒤 해당 유전자의 발현 억제가 성장에 미치는 영향을 분석하였다. 또한 돌연변이주의 유전자 발현 억제 정도를 ATC를 첨가하여 유도한 후 real-time PCR을 통해 확인하였다.

Transcription repression을 직접적으로 확인하기 위해 CRISPRi induction 후 7일차에 ATc를 세가지 농도로 (low: 10 μ g/ml, mid: 30 μ g/ml, high: 100 μ g/ml)로 target gene의 유전자 발현수준을 qRT-PCR을 통해 측정하였다. 선정된 4개의 유전자 모두에서 30 μ g/ml의 ATc를 투여했을 때, 제일 좋은 유전자 발현 억제 효과를 나타내었다 (그림 17 upper panel). 이후 30 μ g/ml의 ATc를 투여했을 때 1일 차, 3일차 및 7일 차에 유전자 발현이 유의적으로 억제됨을 확인하였다 (그림 17 lower panel).

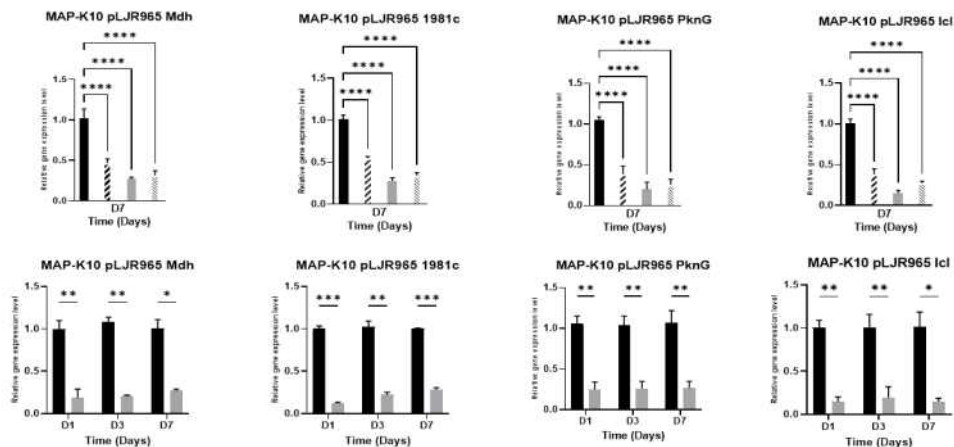
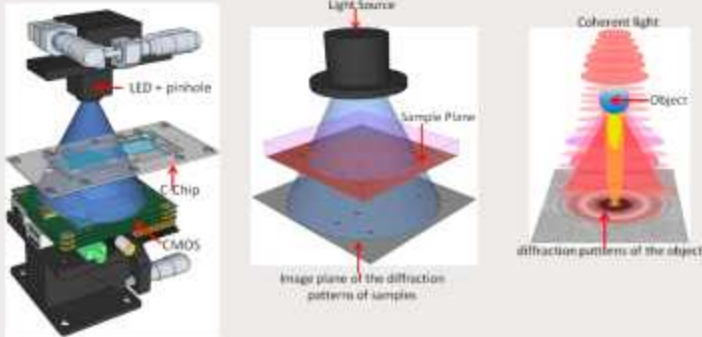



그림 17. MAP mutant에서 ATc 투여에 따른 유전자 발현 억제 비교

4. 소 류코시스의 cell-counter를 활용한 감염우 진단법 평가

- Lens-free shadow imaging technology

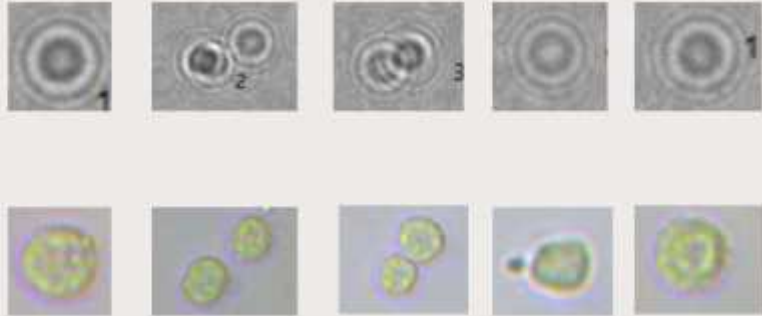
세포에 특정 파장의 가간섭성 빛을 조사하고 발생한 세포의 그림자 이미지(Digital in-line hologram)를 렌즈가 제거된 이미지센서를 이용하여 촬영하고 전용 알고리즘으로 자동분석하여 세포의 계수, 활성도 측정, 표면 및 내부 분석에 응용하는 신개념 세포이미징 기술

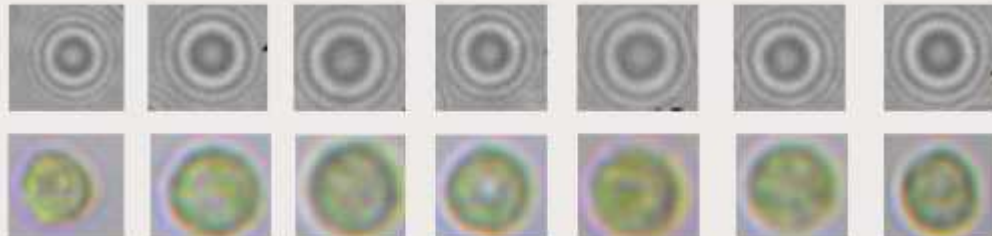
세포의 개수, 크기, 형태, 표면, 굴절률, 과립도 등의 정보
-> 그림자 이미지(hologram)의 차이로 나타남

- BLV Positive 소의 혈액에서 PBMC를 분리하여 이미지 촬영을 실시하였다.

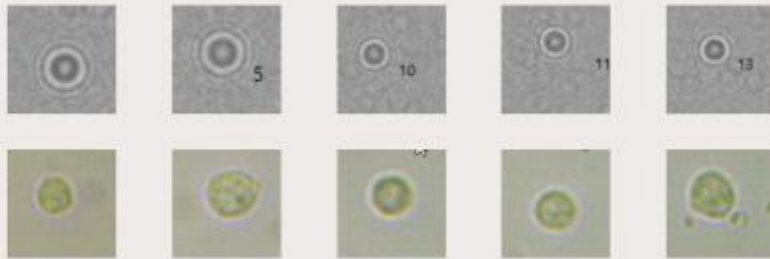
8번 소
Positive
현미경 : x400



235번 소
Positive
현미경 : x400



260번 소
Negative
현미경 : x400



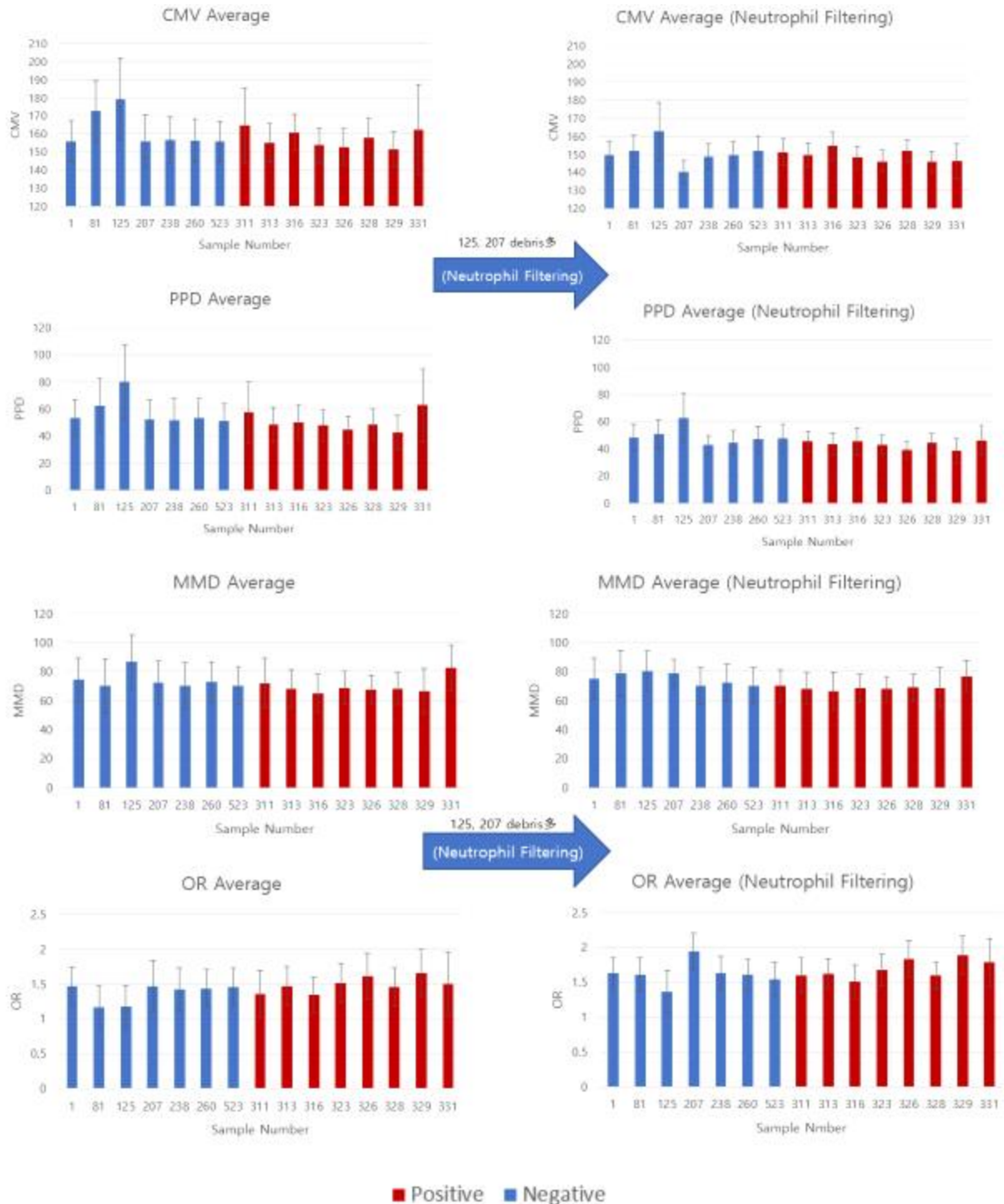
- shadow parameter 비교 분석 결과, BLV positive소에서 CMV가 낮은 경향을 보였다.

Shadow parameter

Positive : 8번 434 cell, 235번 592 cell
Negative : 125번 348 cell, 260번 484cell

Parameter average	8번 양성	235번 양성	125번 음성	260번 음성
CMV	155.8	153.4	164.9	168.3
MMD	67.2	66.8	62.3	68.8
PPD	47.1	44.1	52.4	60.2
SNR[dB]	29.5	32.9	28.4	26.9

- BLV 양성우 8두와 음성우 7두에서 PBMC를 분리하여 재검증하였고, PBMC의 대부분을 차지하는 neutrophil을 CBC 결과를 기준으로 filtering을 실시하였다.



- Filtering 결과, LSIT 기술을 이용하여 세포들의 형태적 차이를 확인하기에는 어려움이 있었다.

5. 목장 단위에서 소 류코시스 질병관리법 평가

- 경제성 저하를 호소하는 3개 목장을 선정하여 혈액 검사를 실시하였다.
- 각 젖소목장의 주 호소는 상이하였다. 세 농가 모두 개체들에 대한 신체검사 결과, 유의미한 이상은 없었으나, 혈액검사 결과 일부 개체에서 lymphocytosis가 확인되어 nested-PCR에 의한 소 류코시스 진단을 실시하였다.

번호	목장 위치	주 호소	채혈 두수	PCR 진단 결과 양성 두수	양성율(%)
1	충청남도	알콜불안정유	25	20	83.3
2	경기도	분만회복 지연	10	9	90.0
3	경기도	준임상형 유방염	16	13	81.3
계			51	42	82.4

- 일부 젖소농장에 대한 결과라는 제한점이 있으나, 예상했던 것보다 높은 양성율을 보였으며, 소 류코시스의 경우 여러 경로를 통해 동거축에게 전파될 가능성이 있다. 또한 증상이 발병하기 전까지는 농가에서 감염 개체를 선별하는데에 어려움이 있다. 따라서 국내 농가에 대한 전반적인 소 류코시스 감염 모니터링이 필요하며, 전파 방지 및 근절을 위한 소 류코시스 관리법에 대한 방안 강구가 요구된다.

※ 4차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

4년차에는 국내 사육 소 농장으로부터 수집한 35개의 분변 및 32점의 혈청에 대하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 분변 및 혈청가검물은 1, 2 및 3년차와 동일한 방법으로 검사를 수행하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP의 분리, 동정을 실시하였다. 요네병 양성 분변 샘플의 경우 Versa-TREK을 이용하여 샘플 내 요네병균 배양 여부 확인 후 7H10 agar plate에 도말하여 균 colony를 형성한 경우 이를 집락으로부터 MAP IS900 유전자 primer를 사용하여 PCR 검사를 통해 MAP 균임을 확인한 후 다음 사용시 까지 -70°C 에 보관하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

총 32두의 소에서 채취한 35개 분변 샘플, 32점의 혈청 샘플에서 진단검사를 진행하여 각각 분변 샘플에서 6두 (17.1%), 혈청 샘플 1두 (3.1%)에서 요네병 양성을 나타내었다 (표 15).

표 15. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=35)	
	분변 (n=35)	혈청 (n=32)
양성	6	1

음성	29	31
----	----	----

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 16 과 같다.

표 16. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	160XX	양성	양성 (74.5)
2	220XX	-	42.3
3	J18XX	양성	9.2
4	160XX	양성	9.3
5	170XX	-	9.1
6	220XX	-	4.2
7	220XX	-	3.1
8	J18XX	-	4.4
9	J18XX	-	6.5
10	PXX	양성	-
11	PXX	양성	-
12	PXX	양성	-
13	88XX	-	0.8
14	89XX	-	1.5
15	66XX	-	1.8
16	32XX	-	2.8
17	85XX	-	1.2
18	81XX	-	2.8
19	29XX	-	4.0
20	75XX	-	3.9
21	26XX	-	6.2
22	30XX	-	1.0
23	30XX	-	2.3
24	31XX	-	1.6
25	28XX	-	2.4
26	73XX	-	10.0
27	28XX	-	2.1
28	95XX	-	2.6
29	30XX	-	1.7
30	30XX	-	3.7
31	84XX	-	1.8
32	56XX	-	5.1
33	75XX	-	4.1
34	61XX	-	6.4
35	54XX	-	8.1

2. MAP 돌연변이 주 제작 및 특성 분석을 통한 신규 병원성 인자 규명 - 3년차 계속

MAP 돌연변이주의 target gene 이 MAP 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 ATc 로 target 유전자 발현을 조절하면서 성장곡선 (growth curve) 을 작성하였다. 4개의 유전자중 mdh 유전자의 발현을 억제했을 때 MAP 성장이 억제됨을 확인할수 있었다 (그림 18).

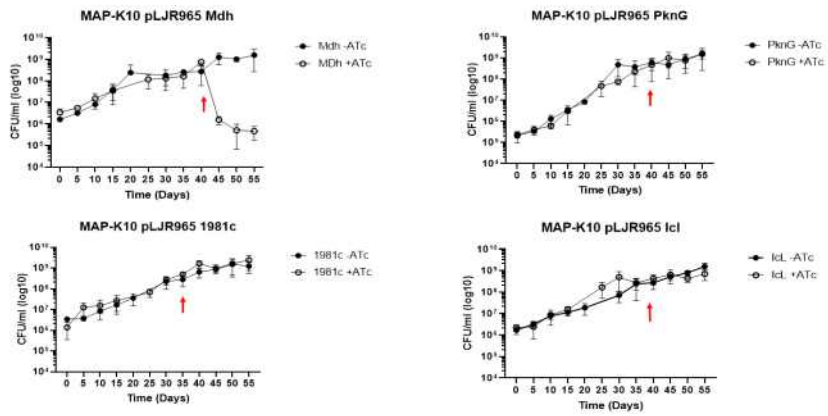


그림 18. MAP mutant에서 ATC 투여에 따른 성장 형태 비교

MAP의 target gene에 대한 CRISPRi gene silencing이 성장 및 표현형에 미치는 영향을 분석하기 위하여 CRISPRi knockdown MAP mutants를 30 μ g/ml ATc의 첨가 여부에 따라 3 가지의 성장 악조건 (stressful conditions) 즉, 영양고갈(nutrient starvation), 산화능(oxidative stress), 및 산성조건 (acidic stress) 속에서 14일간 성장능 (bacterial viability)을 비교 분석하였다. 이때 Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress, 1981c mutant는 oxidative stress 및 acidic stress에서 생존능 (survival)이 감소함을 확인 하였다 (그림 19).

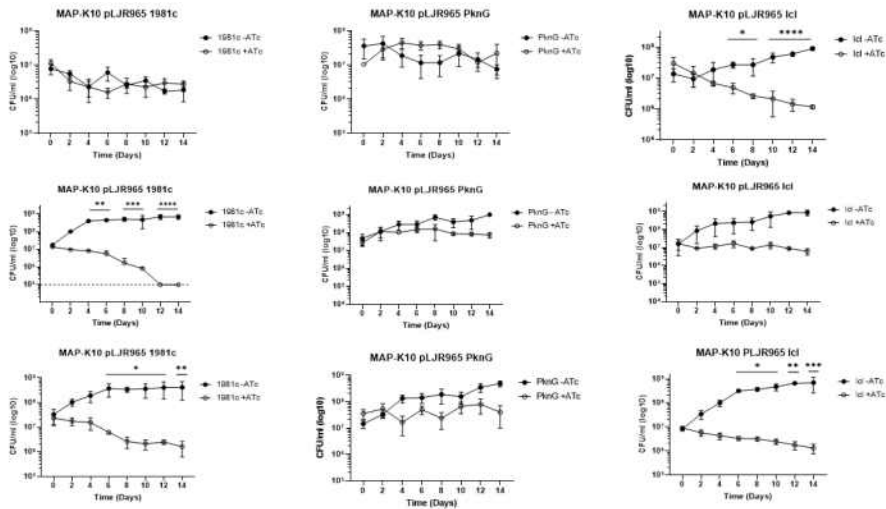


그림 19. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 생존률

CRISPRi를 통한 target 유전자 (PknG, MAP1981c 및 Icl)의 발현 억제가 stress 조건하에서 MAP 집락의 형태 (colony morphology) 및 응집능 (aggregation)을 관찰하였다. 관찰 결과, PknG mutant는 nutrient starvation, 1981c mutant는 oxidative stress, Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress에서 집락의 형태 및 응집능에서 변화가 발생함을 확인하였다 (그림 20 및 21).

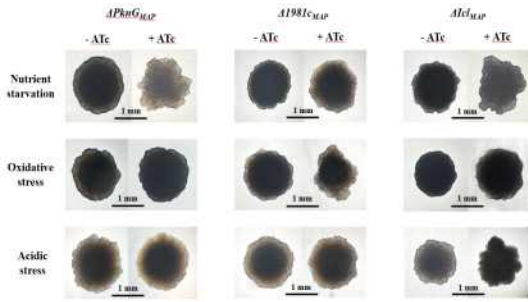


그림 20. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 집락 형태 변화

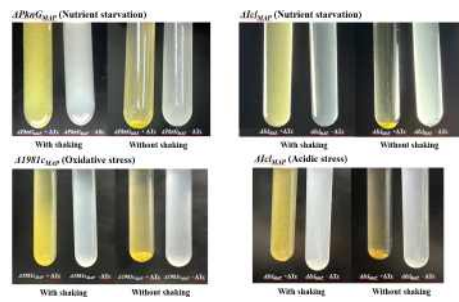


그림 21. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 균체응집 변화

CRISPRi system 을 이용한 MAP mutants 가 특정유전자 발현의 억제 및 stress 조건하에서 envelope 표면의 변화를 Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) 을 이용하여 관찰한 결과 특정유전자 발현의 억제와 각 stress 조건에서 세포의 크기의 감소 (shortness), 표면의 위축 (shrinkage) 에 차이가 나타났다. 즉, MAP 의 PknG mutant 는 nutrient starvation 조건에서, MAP1981c mutant 는 oxidative stress 조건에서, Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress 조건에서 발현억제에 따른 세포크기의 감소 및 표면의 위축에서 차이를 나타내었다 (그림 22).

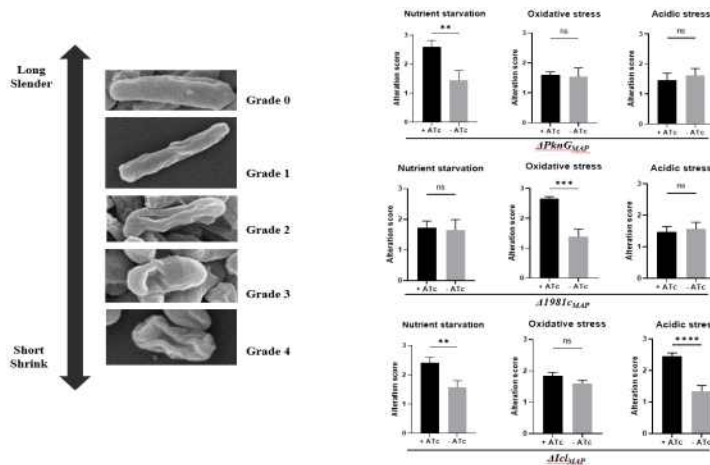


그림 22. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 균체변화

결론적으로 Mycobacteria의 pathogenesis와 관련된 유전자를 선정하고, 선정된 유전자들을 대상으로 CRISPRi system을 사용하여 제작된 MAP mutant를 통해 각 유전자 발현 억제 및 여러 stress 조건 따른 pathophysiological characteristics를 비교 및 관찰하였다. 선정된 유전자의 발현 억제를 수행했을 때 발생할 수 있는 성장특성 및 다른 stress 조건하에서 survival rate의 비교는 MAP의 성장에 필수적인 유전자 확인 및 intracellular survival과 연관된 유전자에 대한 정보를 제공하였다. 그리고 선정된 유전자의 발현 억제 유무 및 다른 stress 조건에 따른 colony morphology and aggregation 관찰을 수행하였다. 또한 mycobacterial envelope alteration을 단계별로 나누고 scoring을 통해 어떤 조건에서 어떤 gene의 유전자 발현을 억제했을 때 surface가 변화하는지 관찰하였다. 변화에 따른 유전자가 외부 침입자에 대한 숙주의 defense process에 대항하여 살아남는 survival mechanism 과 관련된 다양한 physiological process와 연관성이 존재하는 유전자라고 생각한다. 이러한 결과는 CRISPRi를 사용한 MAP mutant 제작을 통해 mutants의 성장, 여러 stress 조건하에서 생존 및 집락형태 (colony morphology) 의 특성이 MAP 감염이나, 발병과 매우 밀접한

관련성이 있다는 것을 시사하고 있다.

3. 요네병의 조기진단에 의한 우군 청정화 방법 개발

요네병 (Johne's Disease 또는 Paratuberculosis)은 요네병균 (MAP) 감염에 의한 반추류의 만성, 소모성 질병으로, MAP 감염되면 긴 잠복기 후 산유량감소, 만성의 설사로 쇠약, 급격한 체중감소 등의 임상증상 발현 후 폐사하는 전염병이다. 이 질병은 우리나라 뿐만 아니라 미국, 유럽 등 여러 나라에서 발병하고 있으며 생후 4개월 이내의 어린 송아지 시절에 주로 감염되어 긴 잠복기 (2~3년)를 거쳐 초기에 특별한 임상증상의 발현 없이 분변을 통해 다량의 균을 배출하여 주변 환경을 오염시켜 주요 오염원으로 작용한다. 분변으로 배출된 요네병균은 목장 내의 물, 사료, 우유 및 주위 환경을 오염시켜 목장 내에 지속적으로 감염이 발생된다. 이때문에 한번 질병이 발생한 목장에서는 이질병의 근절이 매우 어렵다. 특히 요네병균은 외부환경에서 높은 저항성을 가지고 있어서 오랫동안 생존할 수 있는 특성을 가지고 있어 한번 환경이 오염되면 지속적인 발병을 유발한다.

요네균의 감염은 크게 4단계로 나누어 볼 수 있는데, 1단계는 “잠복감염” 상태로 이 시기의 동물은 임상 증상을 전혀 보이지 않으며, 분변을 통해 균을 배출하지도 않는다. 2단계는 “준임상형”상태로 1단계와 마찬가지로 임상 증상을 전혀 보이지 않지만 분변을 통해 균을 환경으로 배출하여 질병의 전파에 중요한 매개체로 작용한다. 특히 이 단계에서 대부분의 개체들은 혈청학적으로도 양성을 나타내지 않는다. 3단계와 4단계는 “임상형”, “진행된 임상형” 상태로 분변을 통한 다량의 균배출과 함께 만성적인 설사, 쇠약을 비롯한 전형적인 임상 증상을 보이면서 폐사에 이르게 된다. 이러한 임상증상의 발현으로 요네병은 젖소와 육우에 있어서 산유량 감소, 성장률 저하 및 감염동물의 도태 등에 의한 많은 경제적인 손실을 유발하고 있다.

○ 외국 요네병 방역 사례

일본의 경우 요네병 박멸을 위해 국가에서 체계적인 관리를 하고 있다. 1998년이후 5년 주기로 검사를 모든 목장을 대상으로 요네병 검사를 시행하고 있다. 정기적인 검사를 통해 목장의 등급을 정하여 관리하고 있다. 한번이라도 감염된 목장은 국가에서 지속적인 관리를 하며, 위생상태를 검사받게한다. 또한 목장주를 대상으로 위생관리교육을 실시하며, 진료수의사의 협조를 받아 지속적인 목장의 위생상태를 관리한다. 또한 분변검사를 통해 분변으로 균을 배출하는 개체들은 도태를 권고하고 있다. 감염동물의 조기검출을 위한 지속적인 연구를 수행하고 있다. 이처럼 목장의 정기검사, 목장의 등급 설정, 감염목장의 지속적인 모니터링등을 통해 질병을 감소시키고자 한다. 무엇보다도 감염된 개체와 접촉하였던 개체들의 지속적인 검사 및 도태 권고 또한 목장 내에서의 2차적인 전파를 예방한다.

호주의 경우 1911년 수입소의 검역과정에 요네병을 처음 확인한 이후 급격한 발생을 보였으나, 국가단위의 목장인증프로그램 (Australian Johne's Disease Market Assurance Program for Cattle)을 1996년부터 시행하고 있어서 이후 몇 번의 시행착오를 거쳐 젖소목장의 요네병 감염상황에 따른 평가시스템 (National Dairy BJD Score)을 개발하였고, 이 system을 이용하여 각 목장의 등급을 분류하였다. 이 시스템의 적용으로 비교적 성공적으로

요네병을 통제하고 있다고 평가하고 있다. 요네병의 전파를 방지하는 가장 중요한 부분은 실제 목장 내에서 시행되고 있는 방역조치라고 생각된다. 즉 송아지와 감염된 개체의 접촉을 원천적으로 차단시키는 것이 요네병의 전파를 방지하는 중요한 방법으로 제시되고 있다.

미국에서 전국적인 수준의 요네병 검사는 1996년 National Animal Health Monitoring System (NAHMS) 에 의해서 처음 실시한 결과 목장에 따라서 매우 높은 비율로 감염되어 있는 것을 확인하였다. 미국에서 요네병청정화를 위한 자발적인 프로그램을 개발하여 요네병 목장인증프로그램을 시행하고 있으며, 현재 미국 농무부 및 APHIS 의 주도하에 실시하고 있다. 이는 크게 생산자 교육, 목장의 위해도 평가 및 관리, 목장의 등급분류를 중요한 관리요소를 하여 시행하고 있다. 일부주에서는 주자체에서 요네병박멸프로그램을 추가적으로 시행하고 있다. 이러한 위생프로그램의 개발 및 시행으로 위생적인 우유 등 축산식품을 생산하고자 하는 노력을 하고 있다.

스웨덴은 1952년 소 요네병을 법정전염병으로 규정하여 관리하고 있다. 2009년에서 2014년까지 소의 분변 PCR 검사 및 배양검사서 요네병균 (MAP)이 검출되지 않았다. 이는 요네병 방역프로그램인 Swedish Animal Health Service을 운영하면서 매년 모든 목장의 24개월된 소에 대하여 분변 PCR 검사 및 배양검사를 실시하고 있으며, 음성의 횟수에 따라 목장의 등급을 결정하고 있다. 이에 적소의 경우 발생한 경우가 전혀 없으며, 육우의 경우도 2005년에 마지막으로 발병하였다. 감염된 개체가 나온 목장의 모든 개체들을 도태시키며, 이후에도 지속적으로 모니터링 하여 재발 여부를 확인하는 정책이 요네병 근절에 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

네덜란드의 경우 약 54% 의 목장이 요네병양성을 나타내었으나, 2006년부터 요네병 청정화 프로그램을 새롭게 개발하여 적용하고 있다. 우유를 통한 ELISA 검사결과를 바탕으로 목장의 등급을 결정하고 이에 따라 관리하며, 목장의 등급에 따라 우유판매의 제한과 같은 불이익을 받게 한다. 이러한 노력을 통해 비교적 감염된 목장이 많은 실정이었지만 체계적인 농장 분류 시스템의 개발 및 적용, 경제적인 불이익을 통해 양성개체의 도태 유도, 착유우를 대상으로한 검진실시등이 요네병의 전파의 감소에 효과적이었다고 생각한다.

○ 한국형 요네 조기진단에 의한 우군 청정화 프로그램 제안

위에서 언급한 요네병의 특징 및 해외 사례에서 알 수 있듯이, 목장 내부에서 질병의 전파 방지를 위한 사육 환경의 전반적인 개선뿐만 아니라 요네병의 조기진단을 통한 감염 개체 확인 및 분리를 통해 감염 가능성을 원천 차단하는 것이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 따라서 국내 역시 해외의 사례들과 마찬가지로 사육 환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 조기진단법 확보가 필수적이라고 할 수 있다.

해외의 사례들을 통해 각국의 요네병 예방 및 관리 프로그램에 차이가 있기도 하지만, 이에 대한 공통점을 가지고 있다. 이를 바탕으로 한국형 우군 청정화 프로그램을 제안한다.

- ①정기적인 요네병 검진을 수행하고 있었으며,
- ②송아지가 태어난 후 즉시 성축과 분리 사육하여 송아지의 감염 가능성을 차단하였다. 또한
- ③수직 감염의 위험성에 따라 요네병 음성으로 확인된 개체로부터 얻은 안전한 초유를 공급

하여 송아지로의 수직 감염의 위험성을 차단하였다.

④목장 내의 환경을 청결하게 유지하는 것도 중요 정책 중 하나로 특히 분만사나 송아지를 기르는 공간은 청결하게 유지되도록 하였고, 최적의 위생적인 관리를 하도록 하였다.

요네병 양성개체의 경우 정기적인 검사를 통해 양성개체는 즉각 격리하며 이후 설사 등의 임상증상이 나타나게 되면 도태하여야 한다. 또한 임상증상을 보이지 않고, 혈청학적 음성이나, 분변으로 요네병균을 배출하는 준임상형의 검색을 위한 진단법이 확립, 적용하여야 한다. 이들 개체는 다른 개체와 격리하여 사육하면서 다른 개체로의 전파를 차단해야 한다.

외부로부터 새로운 개체를 도입시는 목장 내의 별도의 공간에 일정 기간 격리하면서 혈청 ELISA 및 분변 PCR을 통하여 요네병 음성임을 확인 후 입식 하도록 한다. 수직감염을 차단하기 위해 감염된 개체는 번식을 금지하고 도태시키도록 유도한다. 목장에서는 입식 하는 가축의 수와 목장 내 가축의 요네병 유무 및 검사결과를 상세하게 기록하고 관리하여야 한다. 목장 내 요네병 양성축이 존재한다면 임상증상의 발생 여부 등을 관찰하여 기록하여야 한다. 또한 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지하여 질병 전파의 위험성을 낮추어야 한다.

○ 우군 청정화 프로그램에 따른 목장의 등급 분류 및 사후 관리

요네병 검사 결과에 따른 목장의 등급 분류 및 인증을 위해 일정한 간격으로 주기적인 검사를 시행하여 등급을 분류하도록 하여, 요네병에 대한 목장등급제를 실시하여야 한다. 이러한 목장의 등급제에 따른 경제적 이익을 주어고, 미흡한 목장에는 등급을 높일수 있도록 여러 가지 제도적, 재정적 지원하여야 한다.

검사 대상은 18개월령 이상의 모든 개체를 대상으로 하며 송아지의 경우에는 18개월령 이상이 되었을 때 검사 대상에 추가하도록 한다. 검사 방법은 개체의 혈청을 대상으로 ELISA법을 사용하며, 또한 분변을 채취하여 IS900 유전자를 대상으로 PCR을 시행한 후 ELISA 와 PCR의 두 가지 결과 중 하나 이상에서 양성이 나온 개체를 최종적으로 양성으로 판정한다. 등급 판정 이후에 양성 개체가 발견되게 되면 등급이 1단계씩 하향 판정을 받게 되며, 양성 개체는 즉각적인 격리 조치 후 빠른 시일 내에 도태시키도록 한다. 이처럼 등급의 하향에 대한 대책을 세울수 있도록 국가적인 제도적, 재정적지원이 필수적으로 확립되어야 한다.

○ 맺는말

본 연구에서는 국내 요네병 발생 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네 조기진단을 통한 우군 청정화 프로그램을 제안하였다. 국내의 상황을 살펴보면 요네병 발생 건수와 감염 두수가 최근까지도 지속적으로 증가하였으며 이에 따라 경제적 피해도 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 국내 요네병 근절을 위한 우군 청정화 방법의 개발이 시급한 실정이다. 외국의 사례들을 종합해 보면 정기적인 요네병 검진, 송아지로의 수직 전파 차단 및 목장 내의 사육 환경 개선이 공통적으로 확인되었고, 이런 요소들이 요네병 근절에 핵심적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서 이것을

기반으로 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리 대상으로 중점 관리 요소를 설정하여 요네병 근절 프로그램을 제안하였다. 이 프로그램은 목장을 4등급으로 분류하며 정기적인 검진을 통한 양성개체의 조기 탐색 및 제거, 목장내의 위생관리를 통한 체계적인 관리정책을 제시하고 있다. 따라서 이 프로그램의 적용을 통해 요네병에 의한 경제적 피해를 최소화시키며 나아가 요네병을 완전히 근절할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 2-1세부

● 1차년도 : 가금농장 및 야생조류 유래 전염성질병 실태조사 및 특성연구

- 1) 닭, 오리농장 유래 주요 전염성 질병 실태조사
 - 폐사 등의 임상증상이 나타난 계군의 검체(생환계, 폐사체, 장기, 스왑시료 등) 채취
 - 임상병리학적 평가 및 분자생물학적 검사
- 2) 야생조류 유래 주요 전염성 질병 실태조사
 - 전북 주요 철새도래지의 철새분변 시료 확보
 - 주요병원체(AI, ND, Salmonella 등) 분자생물학적 검사
- 3) 주요 병원체 분리동정
 - 선택배지 및 종란을 이용하여 병원체 분리동정 및 확보
- 4) 바이러스 분리주 유전체 정보 분석
 - 분리주 대상 full genome 또는 variable region 염기서열 분석
- 5) 세균 분리주 항생제 내성 특성연구
 - 분리주 대상 항생제감수성 검사 및 내성패턴 분석

● 2차년도 : 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 상호연관성 규명

- 1) 바이러스 분리주 phylogenetic tree 분석을 통한 연관성분석
 - 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 주요 염기서열 계통분석을 통한 상호 연관성 분석
- 2) 세균 분리주 PFGE 분석을 통한 연관성 분석
 - 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 PFGE 패턴 및 항생제내성 패턴을 종합분석하여 상호 연관성 분석

● 3차년도 : 닭 호흡기성 질병 동시진단법 개발 및 실증

- 1) 닭 전염성 기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 개발
 - Multiplex-PCR 개발 및 민감도/특이도 분석
- 2) 닭 전염성기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 실증
 - 야외분리주 대상 Multiplex-PCR 및 Single-PCR을 비교평가하여 실효성 검증

● 4차년도 : 오리 소화기성질병 동시진단법 개발 및 실증

- 1) 오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 개발
 - Multiplex-PCR 개발 및 민감도/특이도 분석
- 2) 오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 실증
 - 야외분리주 대상 Multiplex-PCR 및 Single-PCR을 비교평가하여 실효성 검증

○ 2-2세부

● 1차년도 : 아프리카돼지열병 모니터링을 위한 구강액 검사 시스템 개발

- 1) 아프리카돼지열병 및 구제역 바이러스의 구강액에서의 검출 시스템 개발
 - ASFV 배양 세포주 개발을 통한 바이러스 확보
 - SPF 돼지유래 PAM에 대한 베트남 ASFV 분리주 감염 실험

● 2차년도 : 아프리카돼지열병의 구강액 모니터링 시스템 현장 적용 시험

1) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 감염 동물실험을 통한 구강액 real-time PCR 검사법 검증 (베트남 NIVR 공동연구)

- ASFV 접종 실험을 통한 구강액 검출 real-time PCR 검사법의 유효성 검증
 - 베트남에서 이유자돈 20마리를 각각 둘로 나누어 ASFV 접종군(10마리) (ASFV_NgheAn_2019, 10^6 HAD₅₀/ml)와 비접종대조군(10마리)를 대상으로 감염 5일째 구강액을 채취하여 real-time PCR을 통해 결과를 비교하였음



[구강액 시료 확보를 위한 돈방 설치 방법]

- real-time PCR 비교 결과 구강액에서 베트남에서 이유자돈 20마리를 각각 둘로 나누어 ASFV 접종군(10마리)와 비접종대조군(10마리)를 대상으로 감염 5일째 구강액을 채취하여 real-time PCR을 통해 결과를 비교하였음

2) 아프리카돼지열병 감염 농장에서의 구강액 모니터링 시스템 현장 적용 시험 실시

- 아프리카돼지열병 감염 농장에서의 구강액 모니터링 시스템의 유효성 평가를 위한 돈군 내 무작위 선정을 통한 혈액 검사 결과와 비교 분석



[베트남 양돈장의 이유자돈]



[베트남 양돈장의 모돈]

- 구강액에서의 바이러스 유전자 추출 방법 최적화
 - 구강액 ASFV spiked sample에서 유전자 추출 키트인 Fecal DNA isolation kit(MO BIO, USA), QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN, USA), Veri-Q Prep M16(Micobiomed, Korea)를 이용한 DNA 추출 후 real-time PCR 분석

◎ 3차년도 : 국가재난형 가축전염병 차단방역 매뉴얼의 효율성 개선 연구

1) ASFV 농장내 유입 요인 차단을 위한 절차의 과학적 근거 마련

- ASFV 농장내 유입을 차단하는 강화된 방역시설(7대방역시설)에 대한 타당성 부여를 위한 과학

적 검증

- 특히 방역당국과 양돈장 간의 이견이 가장 많은 방역 시설인 전실의 차단방역 효과에 대한 과학적 근거 마련이 필요
- 차단방역 효과 확인을 위한 돼지 병원체, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), (VR2332, 1×10^7 TCID₅₀/ml), Classical swine fever virus (CSFV) (LOM 850 strain, 1×10^7 TCID₅₀/ml), Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (SM98Pvac strain, 1×10^7 TCID₅₀/ml), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (NL-11 strain, 1×10^7 CFU/ml)를 방역당국에서 제시한 기준에 부합하는 전실(A), 농장 상황에 맞게 허용된 전실(B) 및 전실 미설치 돈방(C)에 입구에 병원체를 도포하고 복도를 따라 0에서 30 미터까지 15일 동안 병원체를 검사함.
- 병원체 검출을 위한 검사는 real-time qPCR 방법[(Prime-Q PRRSV Detection Kit, Genetbio, Korea), CSFV(VDx[®] CSFV qRT-PCR, Median Diagnostics, Korea), PEDV(Prime-Q PEDV Detection Kit, Genetbio, Korea)] 및 세균 배양(*E. rhusiopathiae*)을 수행함.

2) 아프리카돼지열병 차단방역 매뉴얼에 대한 효율성 개선 : ASF SOP에 대한 분석 및 현장적용시의 문제점 해결 방안 마련

◎ 4차년도 : 국가재난형 가축전염병 관리를 위한 농장 및 지역 위험도 평가 시스템 개발 및 활용

- 1) 아프리카돼지열병 차단방역을 위한 농장 내부 및 외부 위험도 평가 기준 설정
 - 아프리카돼지열병 발생 농장 및 지역의 위험도 평가를 통한 평가 시스템 개발
- 2) 국가재난형 가축질병 제어를 위한 밀집 사육 지역 집중 관리 방안 수립
 - 아프리카돼지열병 및 구제역 등 국가재난형 가축질병 발생 농장 분석을 통한 밀집 사육 농장 및 지역의 공간 분석을 통한 위험도 평가
 - 아프리카돼지열병 및 구제역 등 국가재난형 가축질병 관리를 위한 차별화된 방역 매뉴얼 보완

○ 2-3세부

2-3 세부과제 (전북대 유명조):

국가재난형 진드기 매개질병 감염 방제를 위한 진드기 백신 항원 개발



[연차별 연구내용]

연 차	연구목표	연구내용
1차년도	· <i>H. longicornis</i> 의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library 의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색	· <i>H. longicornis</i> 의 배양 ·실험실 내 진드기의 각 단계별 사육법을 구축 · <i>H. longicornis</i> 유전자 full length cDNA library 의 구축 ·degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색
2차년도	·각 단계별 진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 탐색	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기 유전자 분석 ·면역스크린법에 의한 진드기 유전자 탐색 ·진드기 유래 생리활성유전자의 동정
3차년도	·재조합 유전자의 전염병에 대한 면역성상검사	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기 유전자 분석 ·생리활성 유전자의 발현 및 정제시스템 구축 ·단백질 발현에 따른 영향분석
4차년도	·생리활성단백질의 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기 유전자 분석 ·재조합 항원을 통한 면역증강 및 백신 기술 확보

○ 3-1세부

- PRRSV 감염성 클론에 돼지 IL-2 유전자를 클로닝 기법으로 삽입
 - 이전 연구를 통해 확보되어 있는 PRRSV 감염성 클론과 돼지 IL-2 유전자 활용
 - 클로닝 기법을 이용하여 ORF1b와 ORF2 유전자 사이 공백에 돼지 IL-2 유전자 삽입
- 재조합바이러스, 대식세포와 수지상세포를 이용한 폐 병변 재현
 - 재조합 바이러스를 이용하여 세포 수준에서 대식세포와 수지상 세포를 이용하여 폐 병변 재현
 - TGB, INF 등 사이토카인 분석을 통한 병변 발현 인자 확인
- 돼지접종실험을 통한 폐 병변 발생 원리 증명
 - IL-2 재조합 PRRSV와 야외주를 이용한 동물 접종 실험
 - 세포 수준에서 확인된 병변 발현인자의 유무에 따른 폐 병변 정도 확인
 - PRRS에서 폐 병변 발생 원리 최종 증명\
- PRRSV 미끼항원결정부에 따른 항체 분광형 확인
 - 1) PRRSV 동물 접종을 통해 미끼항원결정부에 대한 항체 라이브러리 확보
 - 사전 연구에서, K418에 비해 질병의 방어에 중요한 중화항체(neutralizing antibody)를 형성하는 능력이 향상된 K418DM이 존재함.
 - K418과 K418DM이 형성하는 항체의 분광형(spectratype)에 차이가 있을 것으로 기대하며 aIRL 항원 결정부(decoy epitope)를 밝혀 낼 수 있을 것으로 기대함.
 - K418 재조합 바이러스를 제작한 후 기존에 미끼 항원 결정부위(decoy epitope)라고 알려진

부분을 double mutation(DM)을 통해 제거하여 K418DM을 제작함.

- K418DM 제작 후 cell cradle에 대량 배양 후 초원심분리기(Ultra-centrifuge)를 사용하여 바이러스의 역가를 증가시킨 후 마우스에 접종하였음.
- K418DM을 접종한 마우스에서 단클론항체가 22개 확인되어 K418DM의 주요 질병 방어 전략인 중화항체를 생성하는 여부를 판단하였으나 단클론항체에서의 중화능력이 확인 되지 않음.

2) NGS 기법을 이용한 항체 라이브러리 분석

- K418DM을 접종한 마우스에서 단클론항체가 38개 중 22개 확인되어 K418DM의 주요 질병 방어 전략인 중화항체를 생성하는 여부를 판단하였으나 단클론항체에서의 중화능력이 확인 되지 않아 항체 라이브러리 분석 진행 중

3) 항체 분광형 분석을 통한 미끼항체 서열 확인

- K418DM을 접종한 마우스에서 단클론항체가 38개 중 22개 확인되어 K418DM의 주요 질병 방어 전략인 중화항체를 생성하는 여부를 판단하였으나 단클론항체에서의 중화능력이 확인 되지 않아 미끼항체 서열 확인 실패.

● PRRSV 생독 및 사독 백신 개발

1) 국내 양돈장에서 PRRSV 국내 우점주 분리 성공

2) 해당 분리주를 사용하여 PRRSV 생독 및 사독 백신을 개발 및 특허 출원

- 2) 이 특허 출원은 국내에서 발생하는 신규한 한국형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 동정하고, 이를 약독화 또는 사독화시켜 제조된 한국형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 예방 백신 조성물을 제공할 수 있을 것으로 기대함

- 3-1세부 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 항체 다양성 연구

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 확인

- PRRSV의 ORF7 부분 중 epitope를 형성하는 서열을 실험실에 존재하는 PRRSV를 접종한 돼지 혈청을 통해 확인한다.

- PRRSV의 ORF7은 structure proteins 들 중 하나로 가장 많은 항체를 생성하는 부위로서 항체를 가장 많이 생성해 내는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역적 특성을 이용하여 PRRSV 항체의 친화력에 대한 반응성을 확인한다.

- PRRSV ORF7 epitope 부분을 문헌 조사등을 통해 확인한 뒤 여러 서열을 항원 peptide로 합성하여 peptide ELISA를 통해 항원 항체 반응성의 증감을 확인

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 미끼 항체 및 중화항체 합성

- PRRSV 미끼 항체 및 중화항체의 아미노산 서열을 확인 후 항체 합성 제작업체에 의뢰.

- 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 ORF7 항원 결정부 확인

- peptide ELISA를 통해 항원 항체 반응성의 증감을 확인하고 증감이 가장 크게 나타나는 부위 중 가장 반응성이 감소된 부분을 직접 변이(site-directed mutagenesis) 기법을 통해 변이 시킨 후 바이러스를 동물접종하여 얻어낸 혈청으로 peptide ELISA하여 항원 항체 반응을 확인함.

- peptide ELISA를 통해 항원 항체 반응이 줄어든다면 ORF7의 항원 결정부가 확인된 것으로 말할 수 있음.

- 3-2세부

<1차년도>

1) 국내 야외 분리주 *Salmonella Gallinarum* 균주 확보 및 항생제 감수성 검사

국내에서 분리된 병원성 *Salmonella Gallinarum* 야외주들의 항생제 내성 패턴을 파악하기 위하여 본 연구팀에서 분리한 7종의 야외주에 대한 항생제 감수성 검사를 실시함

- 전라, 경상 지역의 국내 농장의 가금 티푸스 발병 의심계에서 *Salmonella Gallinarum* 균주를 배양하여 순수 분리 하였음.

- 분리한 *Salmonella gallinarum*은 항원-항체 평판 응집 반응을 이용한 serotyping, *Salmonella Gallinarum* specific polymerase chain reaction과 생화학적 특성을 이용한 선별 배양 시험을 통하여 확인하였음.

- 분리한 *Salmonella Gallinarum* 야외주들에 대하여 96well microdilution 방법을 이용하여 16개종의 항생제에 대한 감수성 검사를 실시하였음. 항생제 감수성 검사의 대상이 된 항생제는 다음과 같은 종류의 항생제를 대상으로 하였음. Ciprofloxacin(CIP), imipenem(IMI), ampicillin(AMP), tetracycline(TET), gentamicin(GEN), streptomycin(STR), nalidixic acid(NAL), cefoxitin(FOX), colistin(COL), ceftazidime(TAZ), cefotaxime(FOT), ceftriaxone(AXO), chloramphenicol(CHL), azithromycin(AZI), amikacin(AMI), trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT) 총 16개의 항생제에 대한 감수성 검사를 진행하였음. 항생제 감수성 결과 판독 기준은 우리나라 국가항생제 내성균 감시 체계(Korea Global Antimicrobial Resistance Surveillance System, Kor-GLASS)와 Clinical and Laboratory standard Institute(CLSI), European Committee on Antimicrobial susceptibility testing(EUCAST2) 기준을 참고하여 판독하였음.

2) 가금 세균성 감염병 시료에 대한 유전자원 확보 및 분석

양계 현장이나 검사기관에서 *Salmonella Gallinarum* 야외주와 *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주를 신속하게 감별하는 것은 매우 중요함. 감별법에는 세균의 당 대사경로 차이에 의한 생화학적 감별법과 *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주 특이 연쇄중합반응(PCR)을 이용한 감별법이 있음. 연쇄중합반응을 이용한 감별법은 생화학적 감별법보다 신속하게 감별을 해낼 수 있는 장점이 있으나 기존에 개발된 *Salmonella gallinarum* 9R 백신주 감별 PCR의 경우 야외주에도 존재하는 유전자를 target으로 하여 세균 DNA의 농도나 PCR 온도 조건에 따라 검출이 어려운 부분이 있음을 확인함. 따라서 전장 유전체 분석을 통해 *Salmonella Gallinarum* 야외주와 *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주의 염기서열 차이를 확인하고 새로운 감별 진단 연쇄중합반응용 primer를 개발하고자함.

- *Salmonella Gallinarum*의 genomic DNA는 Qiagen사의 MagAttract HMW DNA Kit를 이용하여 high molecular weight DNA를 extraction 하였음.

- 추출된 genomic DNA는 Quantus Fluorometer의 QuantiFluor ONE dsDNA system을 이용하여 농도값을 측정해 본 연구팀이 실시한 long read based whole genome sequencing에 요구되는 최소 농도 이상이 되도록 하였음.

- Nanodrop 1000 system을 이용해 $A_{260/230}$, $A_{260/280}$ 값을 확인하고 최종적으로 sequencing 조건을 만족한 DNA sample을 Oxford Nanopore사의 MinION을 이용하여 long read based whole genome sequencing을 실시함.

- Illumina사의 Teraseq을 이용하여 위 8개의 *Salmonella Gallinarum* 균주의 DNA에 대한 short read based whole genome sequencing을 진행하였음.

- 3) 국내 야외분리주와 백신주의 전장 유전체 비교 분석 및 *Salmonella Gallinarum* 백신주 감별법 개발

- *Salmonella Gallinarum* 야외주의 전장 유전체 7개와 *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주 전장 유전체를 Mauve alignment를 이용하여 비교 분석함.
- *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주에서만 나타나는 특정 유전자의 일부 중복에 의한 염기서열 차이를 확인하고 야외주와 백신주를 감별할 수 있는 primer를 Primer3 program을 이용하여 제작함.
- 다양한 온도 조건과 DNA 농도 조건에서 제작한 primer의 성능 및 감지 효율을 평가함.

4) 새로운 SG 야외주/SG9R 백신주 감별 primer의 성능 확인

- 기존의 검역검사본부(SG-L/R primer, SGP-L/R, SG9R-L/R primer) triplex SG/SP/SG9R 감별 PCR법에서 백신 감별 primer인 SG9R-L/R primer set을 새로이 개발한 백신주 특이 primer set으로 대체하여 성능을 확인함.
- 새로운 백신주 특이 primer는 기존의 방법 대비 10배 더 낮은 농도의 SG DNA를 증폭시켜 양성으로 진단할 수 있음을 PCR 반응 결과 확인함

<2차년도>

1) MS/MG 검출 및 분리배양

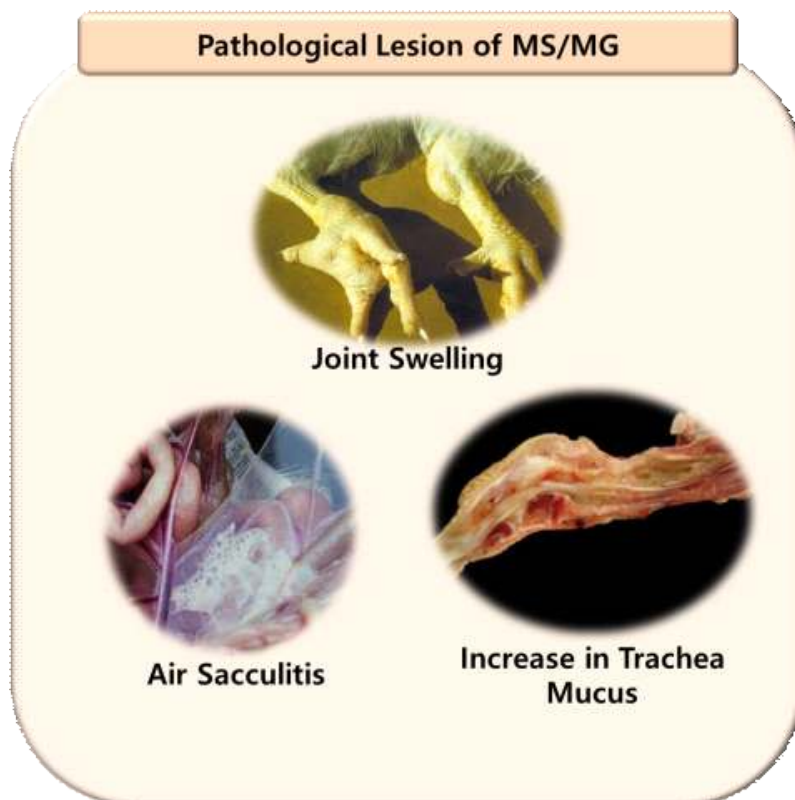
- 본 연구팀은 2021년에 총 80개의 Tracheal and Cleft palate swab 샘플을 채취하여 이에 대한 *Mycoplasma synoviae* (MS) 검출 및 분리 실험을 진행하였음.
- Tracheal and Cleft palate swab 샘플에서 DNA를 추출하여 MS specific PCR과 DIVA MS PCR을 진행하였음. MS specific PCR에서 양성 반응이 나온 경우에는 0.45um filtration을 통해서 MS 외의 세균들을 제거하고 Modified Frey Broth에 접종하여 배양함.
- DIVA MS PCR을 시퀀싱하여 revised *v/hA* 유전자가 백신주의 유전자가 아님을 확인함. 만약 백신주의 유전자로 확인되면 해당 균주에 대한 분리과정은 진행하지 않음.
- 접종액의 색깔이 변하면 접종액을 다시 Modified Frey Agar에 접종하여 37도에서 1주에서 2주동안 배양함
- 배양한 Modified Frey Agar에서 Colony picking을 진행하고 DIVA MS PCR과 universal 16s rRNA PCR을 진행하여 single colony를 picking하였는지 확인함.
- Modified Frey Agar 접종과 Colony picking을 2번 더 반복하고 PCR로 확인하여 순수분리 배양을 진행함.
- MS 검출 및 분리배양의 protocol은 <그림1> 과 같음



<그림1 > MS/MG 검출 및 분리배양 Protocol

2) MS 감염 의심 닭의 부검 및 병변 확인

- MS 감염 의심 닭의 부검을 진행하였으며 기도, air sac, 그리고 관절을 관찰함.
- 기도는 절개하여 분비되는 점액량을 관찰함.
- air sac의 투명도를 관찰하고 이상 병변이 존재하는지 관찰함.
- 관절은 종창되었는지 확인하고 관절액 성상을 관찰함.
- MS 감염시 발생할 수 있는 병변 예시는 <그림2 >와 같음.



<그림2 > MS 감염시 발생할 수 있는 병변 예시

3) 순수분리된 MS에 대해서 항생제 감수성 검사 실시

- 순수분리 배양된 MS의 stock을 제작하여 -70도에 보관함.
- MS stock의 Color Changing Unit (CCU)를 10배씩 희석하여 접종하는 방식으로 확인함.
- $10^3 \sim 10^5$ CCU/ml이 되도록 MS stock을 희석하여 Hannan et al.의 방식을 따라서 항생제 감수성 검사를 실시함. 항생제 감수성 검사는 Enrofloxacin, Tilmicosin, Erythromycin, Spectinomycin, Tylosin, Lincomycin 그리고 Tiamulin에 대해서 진행함.

4) 항생제 내성 진단 유전자 후보군 확인

- NCBI의 sequence read archive에서 항생제 감수성 검사 결과가 존재하는 MS의 sequence를 확보함.
- MS WVU-1853에 대해서 reference mapping을 진행하여 Draft genome을 확보하였음.
- 각 항생제들의 작용 방식에 관여하는 유전자들을 추출하여 multiple sequence alignment를 진행함.
- 각 균주들의 core genome과 accessory genome을 확보하여 항생제 내성을 지닌 균주만이 보유하고 있는 유전자의 유무를 판단함.
- 유전체에 존재하는 Single-Nucleotide Polymorphism이 항생제 내성 여부와 관련되서 공통적으로 발견되는지 확인함.
- 이미 연구된 항생제 내성과 연관된 point mutation을 활용한 PCR이 한국에서 분리한 균주에도 적용 가능한지 확인함.

<3차년도>

1) 기확보한 MS 균주 중 시험 사용 균주 선정

- 본 연구팀은 2021년에 분리한 MS 균주들이 exponential phase에 도달하는 시간을 측정함.
- $10^3 \sim 10^5$ CCU/ml이 되도록 MS stock을 희석한 후 Modified Frey broth의 색깔이 변할때까지의 시간을 측정하여 exponential phase에 도달하는 시간을 측정함.
- exponential phase에 도달하는 시간이 가장 짧은 균주들을 선정하여 이 후 시험에 사용함.

2) Oxytetracycline에 내성을 갖는 MS 제작

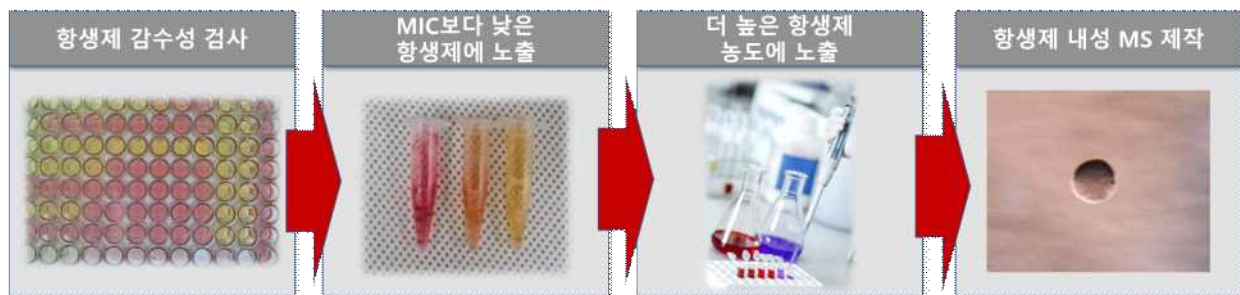
- 선정한 MS 균주의 Oxytetracycline에 대한 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 측정함. $10^3 \sim 10^5$ CCU/ml이 되도록 MS stock을 희석하여 Hannan et al.의 방식을 따라서 항생제 감수성 검사를 실시함.
- Oxytetracycline에 대한 MIC보다 낮은 항생제 농도에서 균을 접종하고 배양함. 가장 높은 항생제 농도에서 배양된 MS 균주를 확보한 후 배양된 균의 Oxytetracycline에 대한 MIC를 다시 측정함. 항생제가 포함된 배지에서 MS를 배양하는 과정은 MS 균주의 Oxytetracycline에 대한 MIC가 Oxytetracycline에 대한 MIC breakpoint보다 높아질 때까지 반복함.

3) Tiamulin 계열 항생제에 내성을 갖는 MS 제작

- 선정된 MS 균주의 Tiamulin에 대한 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 측정함. $10^3 \sim 10^5$ CCU/ml이 되도록 MS stock을 희석하여 Hannan et al.의 방식을 따라서 항생제 감수성 검사를 실시함.

- Tiamulin에 대한 MIC보다 낮은 항생제 농도에서 균을 접종하고 배양함. 가장 높은 항생제 농도에서 배양된 MS 균주를 확보한 후 배양된 균의 Tiamulin에 대한 MIC를 다시 측정함. 항생제가 포함된 배지에서 MS를 배양하는 과정은 MS 균주의 Tiamulin에 대한 MIC가 Tiamulin에 대한 MIC breakpoint보다 높아질 때까지 반복함.

- 항생제 내성 MS 제작 방법에 대한 Protocol은 아래 <그림 1>와 같음.



<그림 1> 항생제 내성 MS 제작 방법

4) 항생제 내성이 발현된 균주의 whole genome 확보 및 유전체 비교 분석

- 항생제 내성이 발현된 균주들에 대해서 NGS를 진행하여 whole genome을 확보함.

- 각 항생제에 감수성을 보이는 계대배양 전 균주의 유전체와 항생제 내성이 발현된 균주의 유전체를 비교 분석함.

- 항생제 내성이 발현된 균주들과 항생제 내성이 없는 균주에서 차이나는 유전자를 확인한 후 항생제 내성과 연관되는 유전자의 Mutation 확인함.

5) Oxytetracycline과 Tiamulin 내성 진단용 PCR 개발 및 적용

- 각 항생제 내성과 연관되는 유전자의 Mutation을 이용하여 항생제 내성 진단용 PCR 개발함. 항생제 내성 진단용 primer는 Primer3 program을 이용하여 제작함.

- 기확보한 MS 균주들을 이용하여 개발한 항생제 내성 진단용 PCR의 성능을 확인함.

<4차년도>

1) 가금 도체 유래 *Salmonella* 분리

- 본 연구팀에서는 닭고기(도체), 시료를 채취하여 2023년에 총 100개의 검체 시료를 채취하여 분리 실험을 진행하였음. 채취한 시료를 이용한 *Salmonella* 검출 실험 방법은 식품공전 검사법을 참고하여 진행함. 본 연구팀에서 진행한 실험 방법은 <그림 >와 같음.



<그림 > 닭 도체에서의 *Salmonella* 검출 실험 방법

2) 가금 도체 유래 *Salmonella* 항생제 감수성 검사

- 분리한 *Salmonella* 들에 대하여 96well microdilution 방법을 이용하여 16개종의 항생제에 대한 감수성 검사를 실시하였음. 항생제 감수성 검사의 대상이 된 항생제는 다음과 같은 종류의 항생제를 대상으로 하였음. Ciprofloxacin(CIP), imipenem(IMI), ampicillin(AMP), tetracycline(TET), gentamicin(GEN), streptomycin(STR), nalidixic acid(NAL), cefoxitin(FOX), colistin(COL), ceftazidime(TAZ), cefotaxime(FOT), ceftriaxone(AXO), chloramphenicol(CHL), azithromycin(AZI), amikacin(AMI), trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT) 총 16개의 항생제에 대한 감수성 검사를 진행하였음. 항생제 감수성 결과 판독 기준은 우리나라 국가항생제 내성균 감시 체계(Korea Global Antimicrobial Resistance Surveillance System, Kor-GLASS)와 Clinical and Laboratory standard Institute(CLSI), European Committee on Antimicrobial susceptibility testing(EUCAST2) 기준을 참고하여 판독하였음.

3) 가금 도체 유래 *Salmonella* 항생제 내성 유전자 확인

- 분리한 *Salmonella* 중 항생제 다제 내성 *Salmonella*에 대해서 Whole Genome Sequencing을 진행함.

- *De novo* Assembly를 진행한 후 항생제 다제내성 *Salmonella*가 보유한 항생제 내성 유전자를 The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)와 비교하여 항생제 내성 유전자의 보유 현황을 확인함.

○ 3-3세부

● 1차년도 : 주요 감염원으로부터 인수공통전염병 유발 병원체 검출 비율 확인 및 유전체 확보

1) 돼지 분변으로부터 바이러스 유전체 추출 및 확보

- 양돈 농장에서 사육단계별 (포유, 이유, 육성, 비육) 분변 시료 채취
- 분변 유제 및 분변 샘플 확보 후 column pathogen extraction 기법을 이용하여 RNA 추출

2) 중합효소 연쇄반응을 통해 유전체 검출 비율 확인

- 중합효소 연쇄반응을 진행하기 위해 노로바이러스 및 E형 간염바이러스 검출 프라이머 제작
- Tm (Melting temperature) 설정 등의 중합효소 연쇄반응 진행 조건 최적화 과정

- 2차년도 : 인수공통전염병 유발 병원체의 유전자 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 특성 조사
 - 1) 확보된 유전체의 유전자 염기서열 분석
 - Sanger-sequencing 기법을 이용하여 확보된 유전자의 염기서열 확인
 - Sequencing primer를 제작하여 부분 및 전장 유전자 확보
 - 2) 각 Open Reading Frame 별 유전자 염기 서열 분석하여 발현될 단백질의 특성 파악
 - Open Reading Frame 별 유전자 염기 서열을 cloning하여 발현벡터에 삽입하여 발현되는 단백질 확인

- 3차년도 : 인수 공통전염병 유발 병원체의 역학적 분석
 - 1) 유전체의 염기서열 분석 결과와 국내외 검출된 유전체의 염기서열과 비교 분석
 - 국내외에서 검출된 바이러스 유전체의 염기서열과 비교하여 nucleotide 유사도 확인
 - 2) 계통분석을 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인
 - 국내외에서 검출된 바이러스 유전체 염기서열을 이용하여 phylogenetic analysis를 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인

- 4차년도 : 인수공통전염병 신속진단 키트 개발
 - 1) 확보된 유전자를 클로닝을 통해 항원 생산
 - Capsid gene을 cloning 후 발현벡터에 삽입하여 capsid protein을 발현시켜 항원 생산
 - 2) 생산된 항원으로 단일클론항체 생산
 - 생산된 항원을 마우스에게 주입하여 단일클론항체 생산 후 키트 개발

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

3.1. 교육분야

○ 충북대학교

1. 특수대학원 설립 추진경과 사항
 - 20년 1월: 본부 대학원과 협의 수의방역대학원 신설 T/O 10명 확정
 - 20년 2월 : 농식품 기술융합 창의인재 양성사업 선정 홍보(2020.02.03.)
 - 20년 3월 9일부터 매주 실무회의 진행(주간회의)
 - 20년 5월: 교육부 2021학년도 대학원 정원조정 신청서 제출
전국 수의방역대학원 키포프 미팅 및 제1차 총괄운영위원회 개최
충북대·전북대·건국대 수의대와 전문인력양성 및 인프라 구축 업무협약 체결
수의방역대학원 설립 및 컴소시엄 대학과 업무협약 체결 홍보(2020.05.25.)
 - 20년 7월: 전국 수의방역대학원 제2차 교육연구개발위원회 개최
교육과정 및 교과목 개발, 주교재 번역 및 부교재 선정
 - 20년 8월: 수의방역대학원 설립 준비위원회 위원 위촉
 - 20년 9월~10월: 2021학년도 전기 대학원입학 모집요강 확정 및 공고
 - 20년 12월: 수의방역대학원 신설 신청 후 단계별 위원회 통과 및 학칙반영 완료
 - 20년 11월~21년 2월: 수의방역대학원 신입생 모집 완료
 - 20년 11월: 제2차 전국 수의방역대학원 총괄운영위원회 개최
 - 21년 1월: 수의방역대학원 운영위원회 위원 위촉
수의방역대학원 제1차 운영위원회 개최(2021.01.18.)
 - 21년 3월: 수의방역대학원 개설
중앙백신연구소, (주)크로넥스와 MOU 체결(2021.03.30.)
 - 21년 4월: 수의방역대학원, 이지캠, 코쿤 MOU 체결(2021.04.08.)
 - 21년 5월: 수의방역대학원, 옵티팜 MOU 체결(2021.05.25.)

- 21년 6월: 수의방역대학원, 성원메디칼 MOU 체결(2021.06.08.)
- 21년 11월~21년 2월: 수의방역대학원 2기 신입생 모집 완료
- 21년 4월: 수의방역대학원 제1차 운영위원회 개최(2022.04.05.)
- 21년 9월: 수의방역대학원, 대한공중방역수의사협회 MOU 체결(2022.9.28.)
- 21년 10월: 수의방역대학원 제2차 운영위원회 개최(2022.10.18.)
- 22년 11월~23년 2월: 수의방역대학원 3기 신입생 모집 완료
- 23년 8월: 제1회 수의방역대학원 학위수여식 개최 (2023.08.18.)
- 23년 11월~24년 2월: 수의방역대학원 4기 신입생 모집 완료

2. 신입생 모집 및 선발 현황

1) 2021학년도 신입생



수의방역대학원 신입생 모집

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2020.11.04.(수) ~ 11.13.(금)
 - 면접고사: 2020.12.02.(수)
 - 합격자 발표: 2020.12.18.(금)
 - 등록금 납부: 2021.1.18.(월) ~ 2021.1.22.(금)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역학	22명	10명

- 선발 현황: 22명 지원자 중 10명 선정

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	2021820001	장O현	발라드동물병원	6	2021820006	황O환	서울보건환경연구원 동물위생시험소
2	2021820002	정O일	농림축산식품부 방역정책국(세종)	7	2021820007	여O섭	중앙백신연구소
3	2021820003	김O욱	충북 동물위생시험소	8	2021820008	조O신	충북 동물위생시험소
4	2021820004	윤O재	육군 의무근무대	9	2021820009	김O영	충청북도청 동물방역과
5	2021820005	연O봉	충청북도청 동물방역과	10	2021820010	한O운	농림축산검역본부(천안)

2) 2022학년도 신입생



수의방역대학원 신입생 모집

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2021.11.03.(수) ~ 11.12.(금)
 - 면접고사: 2021.12.02.(목)
 - 합격자 발표: 2021.12.17.(금)
 - 등록금 납부: 2022.1.17.(월) ~ 2022.1.21.(금)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역학	13명	10명

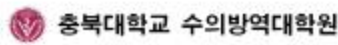
- 선발 현황: 13명 지원자 중 10명 선정

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	2022820001	전O진	마리동물의료센터	6	2022820006	박O성	농림축산식품부
2	2022820002	최O진	아산 농업기술센터	7	2022820007	김O수	축산환경관리원
3	2022820003	정O현	충북동물위생시험소	8	2022820008	배O서	한국생명공학연구원 국가영장류센터
4	2022820004	박O경	농림축산식품부	9	2022820009	정O영	농촌진흥청 국립축산과학원
5	2022820005	장O균	기초과학연구원	10	2022820010	허O현	식품의약품안전처

3) 2023학년도 신입생



원 서 접 수	
접수기간	2022. 11. 2. (수) ~ 11. 11. (금) 09:00 ~ 18:00 *연, 초, 영, 국, 문, 실용사(22~23년 제외)*
접수방법	우편 또는 방문 접수
접수장소	충북대학교 수의방역대학원 행정실 (E112-1동 313호)



수의방역대학원 신입생 모집

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2022.11.2.(수) ~ 11.11.(금)
 - 면접고사: 2022.12.1.(목)
 - 합격자 발표: 2022.12.15.(목)
 - 등록금 납부: 2023.1.16.(월) ~ 1.20.(금)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역학	17명	10명

- 선발 현황: 17명 지원자 중 10명 선정

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	2023820001	이O현	농림축산식품부 농축산위생품질팀	6	2023820006	전O수	한국생명공학연구원
2	2023820002	양O영	(주)케이에이치메디칼	7	2023820007	정O아	세종특별자치시청
3	2023820003	김O경	서울어린이대공원 동물복지과	8	2023820008	정O종	태안군청 산업건설국 농정과
4	2023820004	안O석	서울 보건환경 연구원	9	2023820009	권O영	한국MSD동물의약품
5	2023820005	김O호	괴산증평축산농협	10	2023820010	황O성	중앙대학교 부속농장

- 수의방역대학원 졸업생 중에서 귀감이 될 수 있는 인력양성의 우수 사례에 대한 홍보를 최종보고서가 마무리되는대로 정리하여 진행할 예정임. 이러한 우수사례에 대한 뉴스레터를 작성하여 각 대학 방역대학원 재학생 및 졸업생 등에 홍보할 예정임.

○ 전북대학교

1. 특수대학원 설립 추진경과 사항

- 2020. 2월 : 수의방역대학원 조직위원회 구성 계획안 수립 및 1차 회의
- 2020. 4월 : 수의방역대학원 조직위원회 2차 회의
특수대학원(수의방역대학원)설립
조직위원회 운영 내부 규정 제정
- 2020. 5월 : 수의방역대학원 조직위원회 3차 회의
전국 수의방역대학원 키포프 미팅 및 제1차 운영위원회 개최
(전북대·충북대·건국대 수의대와 전문인력양성 및 인프라 구축 업무협약 체결)
특수대학원(수의방역대학원) 설립 계획서 제출
- 2020. 6월 : 수의방역대학원 조직위원회 4차 회의
교내 홍보기사 게재(뉴스 PLUS)
특수대학원(수의방역대학원) 설립을 위한 대학원위원회심의
- 2020. 7월 : 대학원위원회 등 학무회의 심의 완료(정원10명 배정)
전국 수의방역대학원 제2차 운영위원회 개최
(교육과정 및 교과목 개발, 주교재 번역 및 부교재 선정)
전북도청과 도 대응 활용방안 및 현장인력 재교육 계획 협의
- 2020. 8월 : 특수대학원(수의방역대학원) 설립에 대한 교수 평의원회의
특수대학원(수의방역대학원) 설립에 대한 학칙변경 학무회의
특수대학원 운영규정 및 학칙 개정
- 2020. 9월 : 수의방역대학원 신설 및 운영위원회 구성
- 2020. 10월 : 신입생 모집 시작
- 2020. 11월 : 운영위원회 개최

○ 일반사항

특수대학원명	학위과정	계열	학과명	전공명	입학예정인원
수의방역대학원	석사	의학	수의방역학과	수의방역학	석사 10명

○ 교육과정 : 2021학년도 1학기부터 운영중

학위과정	수업연한	학기운영	수업형태	이수학점	학위종별 (수여학위)	비고
석사	6학기	학기제	야간	33학점	수의학석사 (수의방역학)	학점취득제
	5학기			27학점		논문학기제

2. 신입생 모집 및 선발 현황


1) 2021학년도 신입생 : 17명 지원자중 10명 선정



2021학년도 정시 수의방역대학원 신입생 모집요강

- 석사학위과정(야간제) -

원 서 접 수	
접수기간	2020. 11. 4.(수) ~ 11. 13.(금) (매일 09:00 ~ 18:00) <단, 목요일 및 평선요일(2~3시 제외)>
접수방법	우편 또는 방문 접수
접수장소	수의방역대학원 행정실 (행정동 101-1호)

 전북대학교 수의방역대학원

수의방역대학원 신입생 모집

○ 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형

- 원서접수 : 2020.11.04.(수) ~ 11.13.(금)
- 면접고사 : 2020.12.02. 전북대학교 수의과대학 행정관 3층
- 합격자 발표 : 2020.12.18.(금) 전북대학교 수의과대학 홈페이지 공고
- 총원합격자 발표 및 등록 : 2021.01.29.(금) ~ 02.26.(금)

[선발생 명단]

No.	학번	성명	소속	No.	학번	성명	소속
1	202177001	고**	전북 동물위생시험소	6	202177010	이**	전북도청
2	202177002	김**	(주)우성사료	7	202177014	조**	전북 동물위생시험소
3	202177004	김**	익산시청	8	202177015	조**	다비육종발라드동물병원
4	202177007	박**	한국마사회	9	202177016	진**	전북도청
5	202177008	선**	한일동물병원	10	202177017	최**	전북 동물위생시험소

2) 2022학년도 신입생 : 10명 선정

교내공지

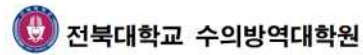
2022학년도 수의방역대학원 신입생 모집 안내

2022학년도 수의방역대학원 신입생 모집 요강을 다음과 같이 안내합니다.

구분	주요 일정	참고
입학관리 및 구비서류 접수 (우편 또는 방문접수)	2021. 11. 3.(수) ~ 11. 12.(금) 18:00 ~ 18:00 * 우편 접수: 11.03(수) ~ 11.09(수) * 방문접수: 11.03(수) ~ 11.12(금)	* 수의방역대학원 행정실 (행정동 101-1호)
면접고사	면접시험: 2021. 12. 2.(화) 09:30 면접시합: 2021. 12. 21(화) 10:00	* 행정동 3층 수의과대학 행정관 3층 * 면접 장소 수의과대학 행정관 3층
합격자 발표	2021. 12. 17.(금)	* 수의방역대학원 홈페이지
합격자 등록	2022. 02. 21(화)	

2022학년도
수의방역대학원 신입생 모집요강
- 석사학위과정(야간계) -

원 서 접 수	
접수기간	2021. 11. 3.(수) ~ 11. 12.(금) (매일 09:00 ~ 18:00) <단, 화요일 및 공휴일 제외>
접수방법	우편 또는 방문 접수
접수장소	수의방역대학원 행정실 (행정동 101-1호)



수의방역대학원 신입생 모집

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수 : 2021.11.03.(수) ~ 11.12.(금)
 - 면접고사 : 2021.12.02. 전북대학교 수의과대학 행정관 3층
 - 합격자 발표 : 2021.12.17.(금) 전북대학교 수의과대학 홈페이지 공고
 - 총원합격자 발표 및 등록 : 2022.01.26.(수) ~ 02.25.(금)

[선발생 명단]

No.	학번	성명	소속	No.	학번	성명	소속
1	202277001	김**	전북 동물위생시험소	6	202277005	안**	경상남도 창원군청
2	202277008	김**	전남도청	7	202277009	유**	충남 동물위생시험소
3	202277003	김**	(주)노터스	8	202277010	장**	전북 보건환경연구원
4	202277004	김**	농림축산검역본부	9	202277006	정**	가톨릭대학 성심교정
5	202277007	성**	농림축산검역본부	10	202277011	주**	청도군청

3) 2023학년도 신입생 : 5명 선정

2022학년도 전북대학교 수의방역대학원 석사학위과정 신입생 모집 안내

2023학년도 전북대학교 수의방역대학원 석사학위과정 신입생 모집요강을 보실수록 많은 안내가 있으니 수의방역대학원에 방문하여 보실바랍니다.

1. 모집인원 : 10명
2. 입학원서 다운로드 : [https://vetmed.jnu.ac.kr/vetmed/index.do?공지사항\(대학원\)-공지사항\(수의대학원\)](https://vetmed.jnu.ac.kr/vetmed/index.do?공지사항(대학원)-공지사항(수의대학원))

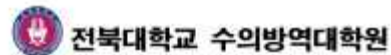
3. 전형일정

구분	기간 및 일시	장소	비고
합격자교량명 접수 (입수시 지원서류 제출) / 우편 또는 방문접수	2022.11.02(수)~11.11(금) * 단, 접수시간(09:00~18:00) 제외 * 방문접수 시 마스크 착용	수의방역대학원 행정실 (행정관 3층 303호)	평일 09:00~18:00 (공휴일 제외)
면접고사	세미나급	제1관 3층 면접실 (행정관 3층 303호)	마스크 착용 신분증 지참 합수증 지참
	면접		
합격자 발표	2022.12.16(금)	(수) 의과대학 홈페이지 공지사항 참조 / 수의방역대학원 홈페이지	홈페이지 공지 / 이메일 확인
등록금 납부기간	2023.01.25(수)~02.24(금) 예정 * 춘방합설기간 다음 날	전북대학교 교내/교외 교지등 교용기간	방주총무처에 연락
입학식(개강식)예정일	2023.03.02(목)		

붙임 2022학년도 전북대학교 수의방역대학원 석사학위과정 신입생 모집요강 1부, 끝

**2023 학년도 정시
수의방역대학원 신입생 모집요강**
- 석사학위과정(야간제) -

원 서 접 수	
접수기간	2022. 11. 2(수) ~ 11. 11(금) (매일 09:00 ~ 18:00) <단, 토요일 및 공휴일(12.25) 제외>
접수방법	우편 또는 방문 접수
접수장소	수의방역대학원 행정실 (행정동 101-1호)



수의방역대학원 신입생 모집

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수 : 2022.11.02(수) ~ 11.11(금)
 - 면접고사 : 2022.12.01(목) 전북대학교 수의과대학 행정관 3층
 - 합격자 발표 : 2022.12.16(금) 전북대학교 수의과대학 홈페이지 공고
 - 총원합격자 발표 및 등록 : 2023.01.25(수) ~ 02.24(금)

3. 향후 운영 방안

- 지자체 및 지역 산업체와의 MOU 체결 등 협력 체계 구축으로 전문인력 안정적 확보
- 기 개발한 비정규 교과과정 활용 대학원 홍보를 통한 우수인재 모집 등
- 전북특별자치도를 비롯한 지자체 및 하림, 동우 등 주요 지역 산업체와의 MOU 등 협력 체계를 구축하고, 기존에 개발한 비정규 교과과정을 활용해 우수인재 확보를 위한 홍보 등 다각적 방안을 강구할 예정임.

○ 건국대학교

1. 특수대학원 설립 추진경과 사항

2020년

- 20.01.17: 수의방역대학원 신설 및 T/O 7명 본부 승인
- 20.02.27: 전문·특수대학원 위원회 개최
- 20.03.01: 수의방역대학원 설립인가; 연간 입학정원 7명, 수의방역전공
- 20.03.13: 규정개정 통과
- 20.05.~06.: 수의방역대학원 원장, 행정실장, 주임교수 발령 및 행정조교임용
- 20.06.05: 수의방역대학원 운영위원회 설립
- 20.06.22: 2020학년도 후기(1기) 신입생 7명 선발
- 20.08.31: 수의방역대학원 개원
- 20.10.22: 수의방역대학원 장학 규정 신설 요청
- 20.11.30: 2020년 경기도 지방보조금 교부 결정

2021년

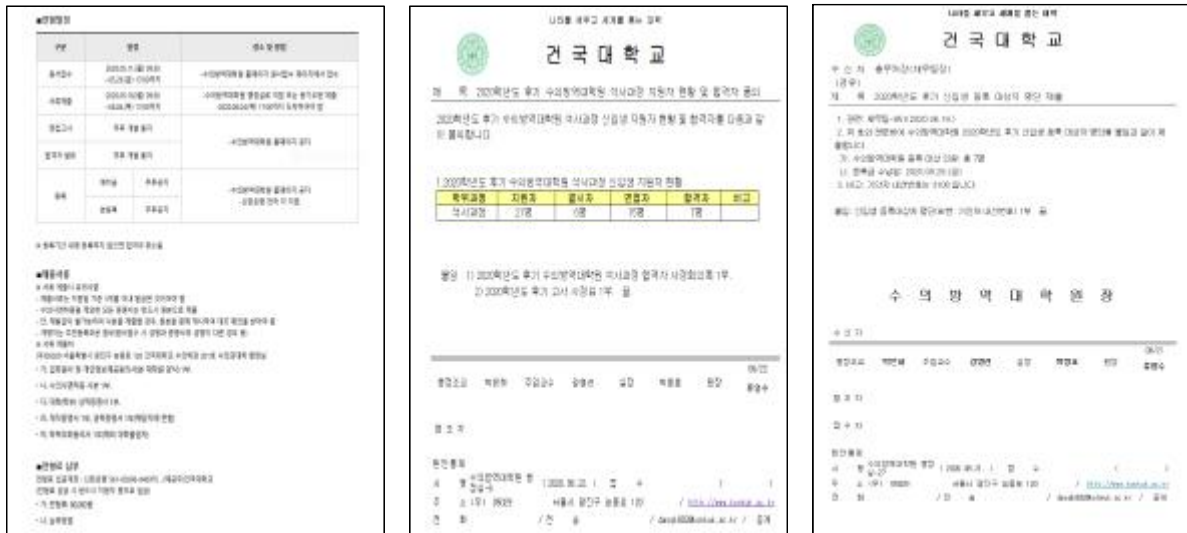
- 21.03.01: 2021년 전기(2기) 신입생 7명 입학
- 21.05.17: 2021년 경기도 지방보조금 교부 결정
- 21.05.28: 제1회 수의방역대학원 춘계세미나 개최
- 21.09.01: 2021학년도 후기(3기) 신입생 1명 입학

- 21.10.23: 개별 맞춤 워크샵 개최(가금)
- 21.10.30: 개별 맞춤 워크샵 개최(양돈)
- 21.12.18: 제2회 수의방역대학원 동계세미나 개최

2022년

- 22.03.01: 2022년 전기(3기) 신입생 7명 입학
- 22.04.20: 2022년 경기도 지방보조금 교부 결정
- 22.04.29: 2022년 제1회 멘토멘트 모임
- 22.06.11: 제1회 수의방역대학원 연사초청 특강 (해외연사 온라인)
- 22.09.14: 제2회 수의방역대학원 연사초청 특강
- 22.09.23: 제3회 수의방역대학원 연사초청 특강
- 22.10.07: 제3회 수의방역대학원 춘계세미나 개최
- 22.11.28: 제4회 수의방역대학원 합동세미나 개최
- 22.12.12: 제5회 수의방역대학원 동계세미나 개최
- 22.12.12: 2022년 제2회 멘토멘트 모임
- 22.12.26: 제6회 수의방역대학원 합동세미나 개최

2. 신입생 모집 및 선발 현황



<2020학년도 후기 수의방역대학원 신입생 모집>

1) 2020학년도 신입생

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2020.05.11.(월) ~ 05.29.(금) 17:00까지
 - 면접일시: 2020.06.12.(금) 14:00 ~ 16:10
 - 합격자 발표: 2020.06.22.(월) 17:00 ~
 - 등록금 납부: 2020.08.21.(금) ~ 08.27.(목)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역전공	21명	7명

- 2020학년도 후기 신입생 명단

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	202079101	한○훈	경기도청 동물방역위생과	5	202079105	이○은	경기도청 동물위생시험소
2	202079102	최○봉	경기도청 북부 동물위생시험소	6	202079106	이○학	충남 동물위생시험소 질병진단과
3	202079103	조○준	경기도청 동물위생시험소	7	202079107	김○석	대한수의사회
4	202079104	정○선	경기도청 동물위생시험소				

2) 2021학년도 신입생

건국대학교
2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정 지원자 현황 및 합격자 발표
2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정 지원자 현황 및 합격자 발표
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

건국대학교
2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정 지원자 현황 및 합격자 발표
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

건국대학교
2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정 지원자 현황 및 합격자 발표
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정(야간) 신입생 모집요강
모집대상: 2021.11.23. (수) 14:00
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정(야간) 신입생 모집요강
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정(야간) 신입생 모집요강
합격자 발표: 2021.11.23. (수) 14:00

<2021학년도 전기 수의방역대학원 신입생 모집>

(1) 2021학년도 전기

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2020.11.02.(월) 09:30 ~ 11.13.(금) 17:00까지
 - 면접일시: 2020.11.20.(금) 14:00
 - 추가모집기간: 2021.11.23.(월) ~ 12.04(금) 17:00까지
 - 추가모집 면접일시: 2020.12.11.(금) 13:00
 - 합격자 발표: 2020.12.16.(수) 14:00 ~
 - 등록금 납부: 2021.02.01.(월) ~ 02.05.(금)

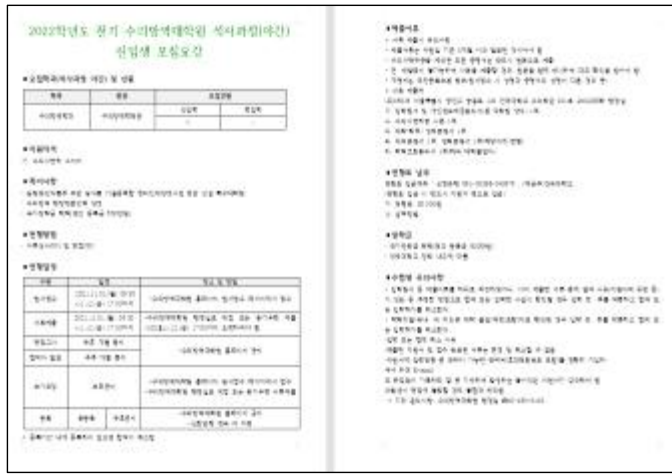
특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역전공	11명	7명

2021학년도 전기 수의방역대학원 석사과정 신입생 지원자				
학위과정	지원자	결시자	면접자	합격자
석사과정	5명	1명	4명	3명
2021학년도 전기 추가모집 수의방역대학원 석사과정 신입생 지원자				
학위과정	지원자	결시자	면접자	합격자
석사과정	6명	0명	6명	4명

○ 2021학년도 전기 신입생 명단

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	20217733 1	엄○운	피그월드 동물병원	5	202177335	김○훈	경기도 북부동물위생시험소 도계검사팀
2	20217733 2	황○수	대산 동물병원	6	202177336	박○환	녹십자수의약품
3	20217733 3	손○환	한성 동물병원	7	202177337	양○열	경기도청 동물위생시험소
4	20217733 4	오○성	경기도청 동물보호과	- 손○환 자퇴(2021.06.07.)			

(2) 2021학년도 후기



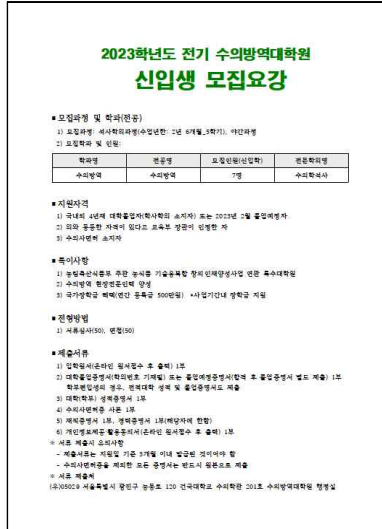
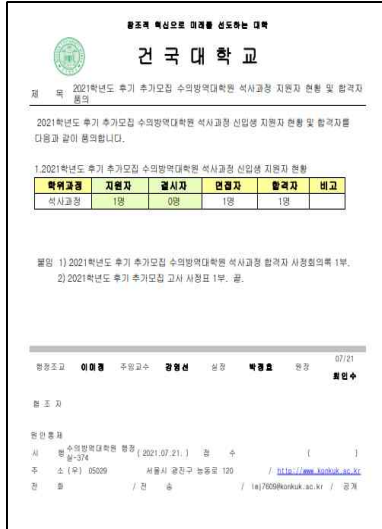
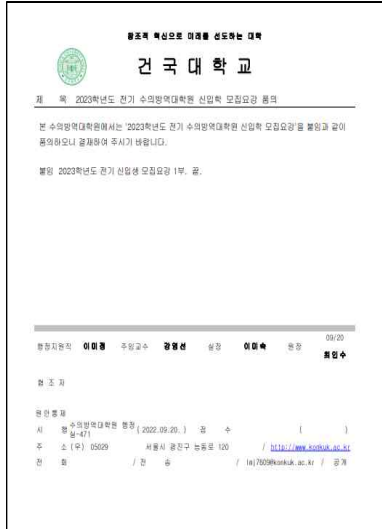
- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 원서접수: 2021.11.01.(월) ~ 11.12.(금)
 - 면접일시: 2021.11.25.(금) 14:00 ~
 - 추가모집기간: 2021.11.29.(월) ~ 12.08(수) 17:00까지
 - 추가모집 면접일시: 2020.12.11.(금) 13:00
 - 합격자 발표: 2021.12.14.(화)
 - 등록금 납부: 2022.02.03.(목) ~ 02.09.(수)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역전공	8	7

○ 2022학년도 전기 신입생 명단

번호	학번	성명	소속	번호	학번	성명	소속
1	202277331	김○선	경기도 동물위생 시험소	5	202277335	이○ 환	김포시 농업기술 센터
2	202277332	김○수	강원도 동물위생 시험소 중부지소	6	202277336	전○ 숙	경기도 동물위생 시험소
3	202277333	서○혜	경기도 동물위생 시험소 남부지소	7	202277337	조○ 성	경기도 동물위생 시험소
4	202277334	심○진	속초시 농업기술 센터				

4) 2023학년도 신입생



- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형
 - 모집기간: 2022.11.04.(화) ~ 11.14.(화) 17:00까지
 - 면접 일시: 2022.11.24.(목)
 - 합격자 발표: 2022.12.16.(목)

특수대학원명	학위과정	학과명	전공명	지원인원	입학인원
수의방역대학원	석사	수의방역학과	수의방역전공	3	2

- 수의방역학과 수의방역학전공 일반전형 (추가모집)
 - 모집기간: 2022.12.12.(월) 09:30~12.23.(금) 17:00까지
 - 면접 일시: 2023.1.5.(목)
 - 합격자 발표: 2023.1.11.(수)

3. 교육분야 목표달성 문제점 및 해결방안

- 1) 문제점
 - 연구과제가 수행되는 3년간 입학정원 100% 달성 및 특수대학원 졸업생 배출에 어려움이 없었으나, 연구과제의 종료로 인한 장학금 지원사업 중단 후 신입생 입학 지원이 급감함.
- 2) 해결방안
 - 건국대학교 수의방역대학원 내규에 수의사만이 아닌 농축산 관련 직종 근무자에서 교내 장학금을 제공할 수 있도록 규정 개정

건국대학교 수의방역대학원 내규

제45조 (장학금, 학비감면) ① 공무원, 국영기업체 임직원, 전공관련 연구기관 및 농축산 관련 직종 근무자에게는 소정의 장학금(학비감면)을 지급한다.

3.2. 특수대학원 운영체계(위원회) 구성 및 운영 등과 관련한 실적

○ 충북대학교

1) 수의방역대학원 총괄운영위원회 구성



수의방역대학원 운영실적

2023년 10월 31일 기준

학사운영 실적

- 1. 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (1) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (2) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다.

2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (1) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (2) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다.

2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (1) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다. (2) 학사운영 실적: 2023년 10월 31일 기준, 2023학년도 1학기 학사운영 실적은 다음과 같다.

수의방역대학원 총괄운영위원회 운영지침

가. 대학원의 사업추진에 관한 주요사항을 심의.조정

1. 대학원 구성, 연간 운영계획 등 심의.조정
2. 대학원 중장기계획 보완, 연도별 사업계획 수립 등 심의.조정
3. 사업과제 발굴 및 기술이전 등에 관한 사항
4. 대학원의 사업수행 점검 및 평가
5. 기타 대학원 운영에 필요한 사항

나. 원장을 위원장으로 하고 참여핵심대학 책임자, 세부과제 책임자 등을 당연직으로 하며, 원장이 임명하는 분야별 전문가를 포함하여 12인 이내의 위원으로 구성

- 위원장: 이완규(총괄책임자, 충북대) 부위원장: 장형관(전북대), 류영수(건국대)
- 교육연구개발위원장: 현상환(충북대) 대외협력위원장: 조호성(전북대)
- 기획홍보위원장: 이상원(건국대)
- 운영위원: 최경철(충북대), 유명조(전북대), 최인수(건국대), 박재명(충북도 동물방역과장), 정현규(도드람 양돈연구소장), 변재원(농림축산검역본부 연구관)

다. 2020. 5.21 : 수의방역대학원(총괄) 운영지침 작성

2) 충북대학교 수의방역대학원 운영위원회 구성

구분	직급	성명
수의방역대학원 위원장	원장	이완규
	대학운영위원장 자체평가위원장	
수의방역대학원 위원	부원장	최경철
	교육연구개발위원장	김수종
	대외협력위원장	이승현
	기획홍보위원장	현상환
	위원	김학현
	위원	정동혁
	위원	민경덕
	위원	서광원

가. 운영위원회는 다음 각 호의 사항을 심의한다.

1. 학과 또는 전공의 설치와 폐지, 학생 정원에 관한 사항
2. 교육과정 및 장학에 관한 사항
3. 대학원 시행세칙의 제정 및 개정에 관한 사항
4. 공개강좌 및 연구과정 등의 운영에 관한 사항
5. 연구개발 사업 및 자체평가에 관한 사항
6. 그 밖에 대학원 운영에 관한 중요 사항

나. 원장과 부원장(주임교수)을 당연직으로 하고, 본교 조교수 이상의 교원중 원장이 임명하는 6인 이상 위원으로 구성하며 위원장은 원장이 된다.

다. 2021. 2. 4 : 수의방역대학원 시행세칙 작성

- 2021. 1. 8 : 수의방역대학원 시행세칙 개정
- 2021. 2. 4: 수의방역대학원 시행세칙 개정
- 2021. 9. 14: 수의방역대학원 시행세칙 개정
- 2022. 4. 7: 수의방역대학원 시행세칙 개정

2022. 10. 18: 수의방역대학원 시행세칙 개정
 2023. 02. 19: 수의방역대학원 시행세칙 개정

3) 수의방역대학원 공간

번호	위치	면적(㎡)	공간
1	E12-1-A215	16.5	BK 초빙교원 연구실/ 수의방역대학원 전임 연구원실
2	E12-1-A415	53.76	수의방역대학원 강의실 I
3	E12-1-A207	48	수의방역대학원 실험실
4	E12-1-A313	21.12	수의방역대학원 행정실
5	E12-1-A314	21.12 이하	수의방역대학원 장비실
6	E12-1-A315	21.12	수의방역대학원 원장실
7	E12-2-201	42.24	수의방역대학원 강의실 II

가. 수의방역대학원 현판



나. 스마트강의실 구축



- 스마트강의실: 스마트보드, 화상강의시스템, 전자교탁 등 화상 강의 및 회의에 사용
- 인테리어: 화상 강의 및 회의에 최적화 된 공간 리모델링
- 가구: 강의에 적합한 책상 및 의자

다. 수의방역대학원 홈페이지 운영
 - 주소: <http://vetsec.cbnu.ac.kr/>



○ 전북대학교

1. 전북대학교 조직위원회 구성 및 내부운영규정 마련
 - 명칭 : 전북대학교 수의과대학 특수대학원 설립 조직위원회
 - 구성 : 위원장 1인, 위원 8인 이내
(학장, 부학장, 학과장, 세부과제책임자 포함 위원 4인)
 - 주요추진 업무 : 2020년 특수대학원(가칭 : 수의방역대학원) 설립 준비
 - 운영현황

일시	회의명	참석자	비고
'20.02.20	전북대학교 수의과대학 수의방역대학원 설립 조직위원회 구성 및 내부규정 마련	조직위원 전원(7명) 및 교육지원실 담당직원	
'20.04.16	수의방역대학원 신설 신청서 작성 및 축종별 교육과정 개발 계획 논의	조직위원 전원(7명) 및 교육지원실 담당직원	
'20.05.06	수의방역대학원 교육과정 및 실습교육 훈련공간 확보방안 논의	조직위원(5명) 및 교육지원실 담당직원	
'20.06.09	수의방역대학원 교과목 개발(안) 마련	조직위원(4명) 및 교육지원실 담당직원	
'20.08.04	수의방역대학원 설립에 따른 후속 조치 (운영위원회, 공간 확보, 예산 지출 등)	조직위원(6명) 및 교육조교	

2. 전북대학교 운영위원회 구성 및 내부운영규정 마련
 - 명칭 : 전북대학교 수의방역대학원 운영위원회(조직위 연임)
 - 구성 : 위원장 1인, 위원 9인 이내, 학장 및 부학장은 당연직
(수의과대학 학장, 부학장, 세부과제책임자 포함 위원 7명)
 - 주요추진 업무 :
 1. 방역대학원 교과과정에 대한 평가, 개선, 조정 및 집행관련 업무
 2. 방역대학원 운영 계획관련 업무
 - 운영현황

일시	회의명	참석자	비고
'20.10.20	수의방역대학원 모집요강 논의	운영위원 7명 및 교육지원실 담당직원	
'20.11.27	수의과대학 수의방역대학원 운영사항 제반 검토	운영위원 7명 및 교육지원실 담당직원	
'22.12.06	2023학년도 수의방역대학원 석사학위과정 신입생 모집 합격사정 동의건	운영위원 7명	서면

○ 건국대학교

가. 계획서상 전용공간지원 협약

나. 공간 배정

변경전			변경후			
호실번호	호실명 (사용자/사용기간)	관리부서	호실번호	호실명 (사용자/사용기간)	사용용도	관리부서
수의학관 201호	행정실 및 전공사무실	수의과대 학 행정실	201	수의과대학 행정실 및 전공사무실	행정실	수의과대학 행정실
			201	수의방역대학원 행정실	행정실	수의방역대학원 행정실
수의학관 202호	학장실	수의과대 학 행정실	202	수의과대학 학장실	행정실	수의과대학 행정실
수의학관 509호	기초실험실	수의과대 학 행정실	509	기초실험실	행정실	수의방역대학원 행정실

- 2020.05.06. 공간배정 요청
- 2020.05.08. 공간배정 승인
- 2022.09.16. 공간배정 요청
- 2022.09.22. 공간배정 승인

다. 첨단강의실 구축

수의학관 432호



- 첨단강의실: 전자교탁, 전자칠판, 화상강의시스템 등 원격화상강의 및 회의에 필요한 장비 구입.
- 가구: 화상회의, 대학원 품격에 맞는 중후한 색상을 사용하여 아늑한 분위기를 연출함. 강의 수강자들에게
유용하고 적합한 책상·의자 및 사물함 구입 완료.

수의학관 523호



- 첨단 계단강의실: 수의방역대학원 증원에 대비하고, 효율적 강의에 적합한 강의실 구축. 일반적인 강의뿐만 아니라 플립드 러닝(Flipped Learning) 강의 진행에 적합하도록 발표시스템, 매트릭스 구입. 상대적으로 협소한 계단강의실에 대형화면을 구현하면서 원가 절감을 위해 전자칠판이 아닌 단춧점 프로젝터 구입.
- 인테리어: 어두운 톤의 바닥으로 안정감을 주고, 화이트톤의 책상과 마감처리, 밝은색 페인트로 벽을 칠하여 밝고 활발한 분위기를 연출.
- 가구: 강의실 사용목적에 따라 유동적인 배치가 가능한 분리형 책상·의자 구입. 전자교탁 우측 벽면에 맞춤 보조 책상을 설치하였고, 강연자의 노트북, 테블릿PC를 연동시킬 수 있도록 HDMI단자, 2구 콘센트를 설치하여 활용성을 높임.

수의학관 509호



- 첨단 음향시스템 도입 : 509호 공간배정을 수의방역대학원으로 변경 후 기존 음향시스템 노후로 인해 새롭게 양질의 시스템 도입 및 새로운 장비 업그레이드.

라. 수의방역대학원 현판 설치

수의방역대학원 행정실 및 학과사무실



수의방역대학원 행정조교실



마. 홈페이지, 유튜브 구축

홈페이지 주소: <http://cvbp.konkuk.ac.kr/index.php>

유튜브 주소: <https://www.youtube.com/watch?v=s-ysMpa2A30>



3.2. 연구분야

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 1-1세부

<1차년도>

가. 세부연구목표: 돼지 세균성 소화기계 감염병 원인체 특성조사 및 분리주 유전자원 확보

나. 연구개발 내용

1) 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물 분포조사 및 유전자원 확보

국내 양돈 약 500농가를 대상으로 소화기계 감염병 환돈의 사육단계별 (포유자돈, 이유자돈, 육성돈, 비육돈)로 구분, 소장 및 대장 시료를 채취하여, 대장균, 살모넬라 등 약 760여 균주를 분리한 후, 선택감별배지, 생화학적 검사, API 동정, 16S rRNA 분석 등을 통하여 미생물학적 특성 조사를 완료하였음.

2) 주요 병원성 원인체의 항생제 내성 특성 조사

항생제 내성 유전자의 지역별 분포를 분석한 결과를 Table 1-1에 나타내었음. 광범위 베타락탐계 항생제 저항 유전자 중 국내에서 가장 우세하게 검출된 것은 *blaTEM* 유전자로, 북부 지역에서 54.8%, 중부 지역에서 54.1%, 그리고 남부 지역에서 57.4%가 검출되었음. 또한, *blaCTX-M* group 1과 group 9은 중부 지역에서 각각 3.4%, 4.5%로 북부 (0.7%, 0.7%) 및 남부 (0.8%, 1.5%)에 비하여 높게 측정되었음. Colistin 내성 플라스미드 매개 유전자인 *mcr* 유전자 중 아직까지 국내에서는 *mcr-2*는 검출되지 않았음. 북부 지역에서는 *mcr-1*과 *mcr-3* 유전자가 각각 1균주 (0.7%)만 검출된 데에 반하여, 중부 지역에서는 3균주 (1.0%), 5균주 (1.7%)가 검출되었고, 남부 지역에서는 4균주 (1.5%)와 2균주 (0.8%)가 검출되었음.

Table 1-1. Antimicrobial resistance genes (%) of *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with diarrhea in northern, middle, and southern Korean farms

Antimicrobial resistance genes	Northern farms (n = 135)	Middle farms (n = 290)	Southern farms (n = 265)
<i>blaTEM</i>	74 (54.8)	157 (54.1)	152 (57.4)
<i>blaSHV</i>	7 (5.2)	17 (5.9)	10 (3.8)
<i>blaOXA</i>	12 (8.9)	22 (7.6)	36 (13.6)
<i>blaCTX-M</i> group 1	1 (0.7)	10 (3.4)	2 (0.8)
<i>blaCTX-M</i> group 2	0 (0.0)	3 (1.0)	5 (1.9)
<i>blaCTX-M</i> group 9	1 (0.7)	13 (4.5)	4 (1.5)
<i>mcr-1</i>	1 (0.7)	3 (1.0)	4 (1.5)
<i>mcr-2</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>mcr-3</i>	1 (0.7)	5 (1.7)	2 (0.8)
<i>AmpC</i>	83 (61.5)	173 (59.7)	158 (59.6)
<i>tetA</i>	100 (74.1)	203 (70.0)	188 (70.9)

2) 주요 병원성 원인체의 병원성 특성조사

최근 2년간 국내 설사 이유자돈에서 분리한 대장균 118균주를 대상으로 편모 부착 인자와 독소 산생 유전자를 분석한 결과 (Table 1-2), 부착인자 조합 중 가장 우세하게 검출되는 것은 F18 (48균주)이며, 뒤이어 F4가 우세하게 검출되었음 (20균주). 독소 산생 유전자의 조합 중 부종병을 유발하는 Stx2e가 25균주로 가장 우세하게 검출되었으며, 설사증을 유발하는 STb:EASt-1와 STa:STb가 각각 23균주, 20균주 검출되었음. 특이하게, 44균주가 어떠한 편모 부착인자도 검출되지 않았는데, 이는 eae, AIDA-I 또는 paa와 같은 비편모 부착인자가 관여한 것으로 사료됨.

Table 1-2. Relationship between fimbriae and enterotoxins in 118 *Escherichia coli* isolated from diarrheic weaned piglets

Enterotoxins	Fimbriae						Total
	F4	F5	F18	F4:F6	F4:F18	None	
LT	0	0	1	0	0	0	1
STa	0	1	1	0	0	1	3
STb	2	0	0	0	0	3	5
EASt-1	1	0	2	0	0	2	5
Stx2e	1	0	15	0	0	9	25
STa:STb	4	1	12	1	0	2	20
STa:EASt-1	0	0	2	0	0	0	2
STb:EASt-1	0	0	1	0	0	22	23
STa:Stx2e	0	0	4	0	0	0	4
Stx2e:EASt-1	0	0	4	0	0	2	6
LT:STb:EASt-1	11	0	1	0	1	2	15
STa:STb:EASt-1	1	0	0	0	0	0	1
LT:Stx2e:EASt-1	0	0	1	0	0	0	1
STa:STb:Stx2e	0	0	1	0	0	1	2
LT:STa:STb:EASt-1	0	0	2	0	1	0	3
None	0	1	1	0	0	0	2
Total	20	3	48	1	2	44	118

<2차년도>

가. 세부연구목표: 주요 병원성 원인체의 항원 및 병원성 유전자 검색을 통한 분자생물학적 특성 조사

나. 연구개발 내용

1) 유전자 지문분석법에 의한 유전학적 상동성 분석

국내 우세 Pathotype 및 Virotype에 대한 유전학적 상동성 및 virotype과 항생제 내성 표현형 사이의 유전학적 연관성을 분석하기 위하여 Multi-locus sequence typing (MLST) 기법을 이용하였으며, 29개의 장독소형 대장균 (*Enterotoxigenic E. coli*: ETEC) 29 균주와 시가 독소 산생 대장균 (*Shiga toxin-producing E. coli*: STEC) 35개 균주를 분석하였다 (Figure 2-1). MLST 분석 결과, ETEC의 72.4%는 ST100으로 검출된 반면, STEC의 57.1%는 ST1로 검출되었음. Neighbor-joining method를 통하여 ETEC 및 STEC 균주의 유전학적 상관관계를 분석한 결과, 5개의 cluster로 구성되어 있음을 확인하였으며, 각 cluster는 특정한 항생제 내성 패턴을 나타내었음. Cluster I은 gentamicin, streptomycin, neomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole과 tetracyclines에 대한 내성 패턴을 보인 반면, cluster V는 ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, cefoxitin, cefazolin, norfloxacin과 colistin에 대한 내성 패턴을 나타내었음.

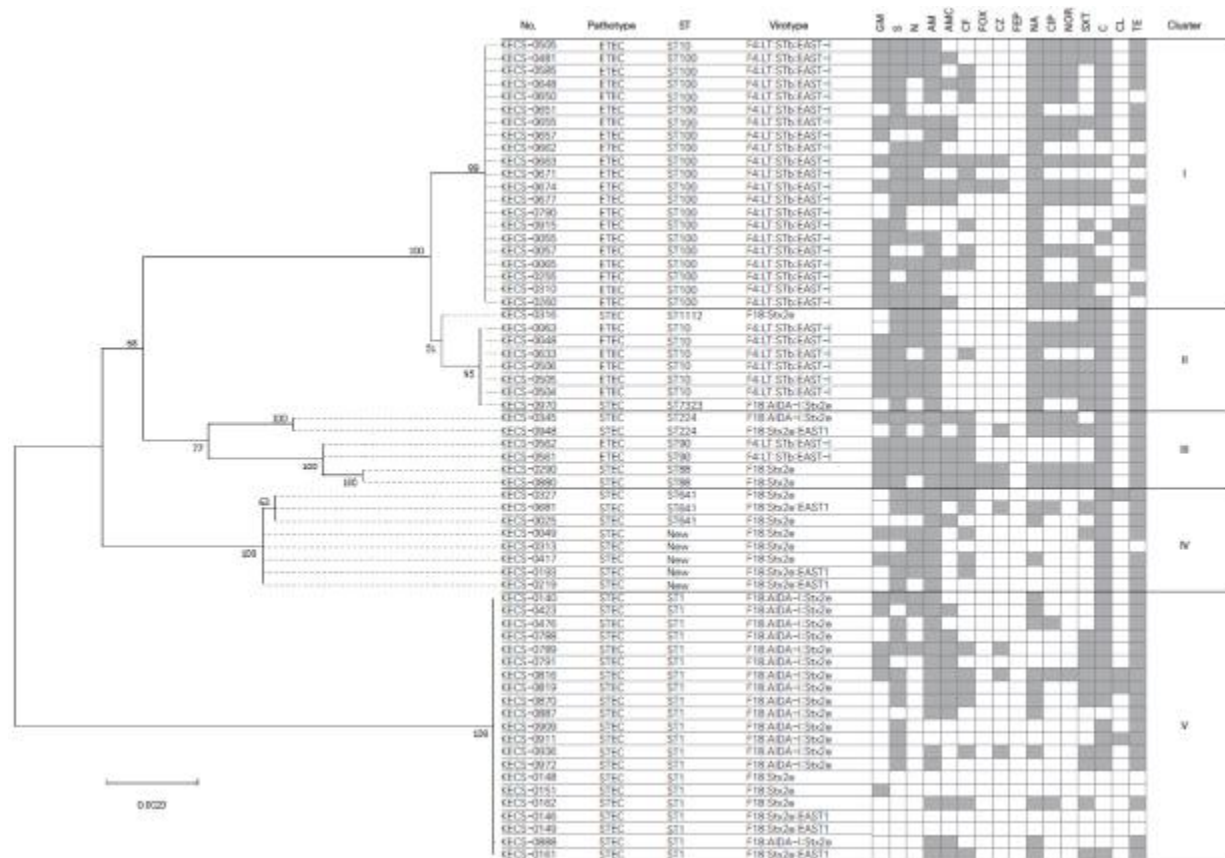


Fig 2-1. Neighbor-joining MLST phylogenetic tree of 29 ETEC and 35 STEC strains. New, New sequence type; GM, gentamicin; S, streptomycin; N, neomycin; AM, ampicillin; AMC, amoxicillin / clavulanic acid; CF, cephalothin; FOX, cefoxitin; CZ, cefazolin; FEP, cefepime; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin; SXT, trimethoprim / sulfamethoxazole; C, chloramphenicol; CL, colistin; TE, tetracycline. Highlighted in light grey represent resistance according to Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

<3차년도>

가. 세부연구목표: 분자생물학적 기법을 이용한 소화기계 감염병 원인균 신속진단검출기법 개발

나. 연구개발 내용

1) 세균성 돼지 소화기계 감염병 진단을 위한 Multiplex PCR법 개발 및 유용성 검증

1차년도 및 2차년도 국내 분리주 및 참조균주를 대상으로 개발한 Primer를 Table 3-1에 기재하였으며, multiplex PCR 기술을 적용한 결과를 아래 Fig 3-1에 나타내었음. 상기 프라이머를 Gram negative 세균인 *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis* 및 *S. Enteritidis*의 조합으로 PCR 분석한 결과, 각 PCR 증폭산물의 size인 506 bp (*E. coli*), 770 bp (*L. intracellularis*) 및 185 bp (*S. Enteritidis*)에 밴드가 나타나고, Self-dimer는 형성하지 않음을 확인하였음 (Fig 3-1). Gram positive 세균에 해당하는 *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Clostridium perfringens*에 대한 프라이머의 조합으로 PCR 분석한 결과, 379 bp (*B. hyodysenteriae*) 및 275 bp (*C. perfringens*)에서 밴드가 나타나며, 이외의 위치에는 밴드가 나타나지 않음을 확인하였음. 이를 통하여 디자인한 프라이머가 Multiplex PCR을 진행할 시 Self-dimer 등을 형성하지 않으며, 돼지 소화기계 감염병 원인체의 신속진단을 위하여 유용하게 활용할 수 있는 것을 확인하였음.

Table 3-1. 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물 5종의 검출 Primer

Target	Primer	Length (bp)	GC(%)	T _m (°C) ¹⁾	Product size (bp)
<i>Escherichia coli</i>	F: GCATGTGGTTTAATTC	16	38	53	506
	R: CGAAGTTAAGCTACC	15	47		
<i>Salmonella</i> spp.	F: GTCTACTTGGAGGTT	15	47	53	185
	R: TTCTGTGGATGTCAA	15	40		
<i>Clostridium perfringens</i>	F: CTAACGCATTAAGTATTC	18	34	53	275
	R: TAATGGTAGTAACACTACG	18	34		
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	F: AGTCTTGGATATTGTAGG	18	39	53	379
	R: GGTCTGACTTATCTCTAA	18	39		
<i>Lawsonia intracellularis</i>	F: CTGGACGATAACTGA	15	47	53	770
	R: ACCTTGTTACGACTT	15	40		

¹⁾ T_m: Annealing temperature

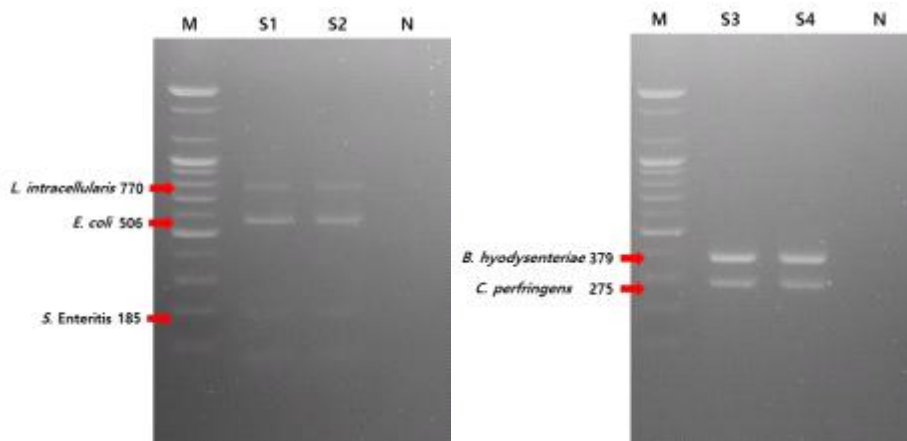


Fig 3-1. 돼지 세균성 소화기 질병 원인체 5종의 multiplex PCR 검사 결과. M: 100 bp DNA ladder (Cat # D-1030, Bioneer, Korea); S1 및 S2: 야외분리 *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis 균주 및 *L. intracellularis* BA2100523의 genomic DNA 혼합물; S3 및 S4: 야외분리 *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Clostridium perfringens*의 genomic DNA 혼합물; N: Negative control.

<4차년도>









가. 세부연구목표: 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발

나. 연구개발 내용

1) 신속진단 키트 개발, 재현성 검증 및 감염병 원인체별 검출한계값 조사

3차년도 연구수행 결과를 바탕으로 각 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물을 신속하게 진단, 검출할 수 있는 키트의 시제품을 제조하였음. 시제품은 Table 4-1의 *Salmonella* 검출용 프라이머 세트(Salmo_invA_F; Salmo_invA_R), 병원성 대장균 검출용 프라이머 세트(E_coli_STX2e_F; E_coli_STX2e_R), *C. perfringens* 검출용 프라이머 세트(Perfringens_F; Perfringens_R), *Brachyspira hyodysenteriae* 검출용 프라이머 세트(Brachyspira_F; Brachyspira_R), *Lawsonia intracellularis* 검출용 프라이머 세트(Lawsonia_F; Lawsonia_R)를 포함하며, PCR 반응으로 각 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물을 신속하게 진단, 검출할 수 있음.

시제품은 신속한 진단, 검출을 위하여 DNA polymerase, PCR용 반응 buffer, dNTP Mixture를 혼합한 pre-made 제품으로, PCR 반응시 buffer, dNTP mixture 등을 따로 첨가할 필요가 없이 조작성 간편하게끔 아래 Table 2와 같이 조성하였음. 시제품 조성의 Taq DNA polymerase는 Bioneer사(E-2011-3)을 사용하였고, 각 deoxynucleotide triphosphates (dNTP)는 Thermo-Scientific사의 dATP solution (Cat# R0141), dTTP solution (Cat# R0171), dCTP solution (Cat# R0151) 및 dTTP solution (Cat# R0171)을 사용하였음. PCR buffer 조성성분은 Thermo-Scientific사의 Tris-HCl (pH 8.0) (Cat# 15568025), Invitrogen사의 KCl (2M) (Cat # AM9640G) 및 MgCl₂ (1M) (Cat # AM9530G)을 사용하였고, 각 Primer는 3차년도 연구결과의 염기서열을 사용하였음.

							
Taq DNA Polymerase	dATP solution	dTTP solution	dCTP solution	dTTP solution	MgCl ₂	KCl	Tris-HCl (pH 8.0)

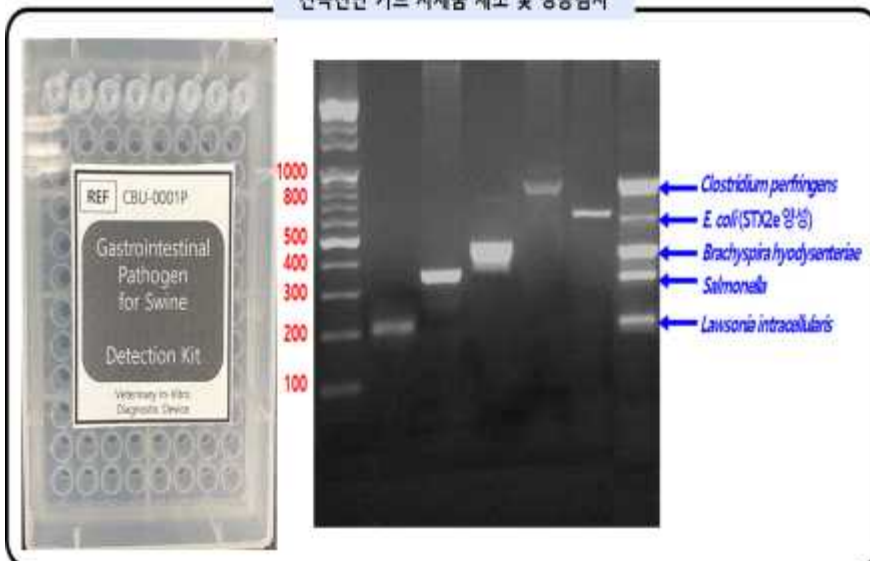
신속진단 키트 제조용 시약 Mixing







신속진단 키트 제조를 위한 시약 분주



신속진단 키트 시제품 제조 및 성능검사



<신속진단 키트 시제품 개발>

단계		세부 절차																												
1	 <p>주형 DNA 분주</p>	<p>1. Rectal swab 시료를 충분히 끓인 후 탁상형 원심분리기에서 최대 속도로 Spin-down한 뒤 상층액을 취득함으로써 주형 DNA를 준비합니다.</p> <p>2. 돼지 주요 감염병 신속진단 키트에 주형 DNA를 2 μL 분주합니다.</p>																												
2	 <p>반응용액 조성</p>	<p>3. 최종 반응용액의 부피가 20 μL가 되도록 3차 증류수를 신속진단 키트에 분주합니다. (신속진단 키트를 18 μL 분주합니다.)</p> <p>4. 반응용액을 vortexing하여 내용물을 완전히 녹인 후 spin down합니다.</p>																												
3	 <p>PCR 반응</p>	<p>5. 신속진단 키트 PCR tube를 Thermal cycler에 장착합니다.</p> <p>6. 다음과 같이 PCR 조건을 설정합니다.</p> <table border="1" data-bbox="574 1108 1316 1433"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Temperature</th> <th>Time</th> <th>Cycles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pre-denaturation</td> <td>95 °C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Denaturation</td> <td>95 °C</td> <td>20 sec</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Annealing</td> <td>58 °C</td> <td>20 sec</td> <td>30 cycles</td> </tr> <tr> <td>Extension</td> <td>72 °C</td> <td>1 min</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Final extension</td> <td>72 °C</td> <td>5 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>Cooling</td> <td>4 °C</td> <td>-</td> <td>1 cycle</td> </tr> </tbody> </table> <p>• 상기 조건은 Thermal cycler에 따라 변경이 가능합니다.</p>	Step	Temperature	Time	Cycles	Pre-denaturation	95 °C	5 min	1	Denaturation	95 °C	20 sec		Annealing	58 °C	20 sec	30 cycles	Extension	72 °C	1 min		Final extension	72 °C	5 min	1 cycle	Cooling	4 °C	-	1 cycle
Step	Temperature	Time	Cycles																											
Pre-denaturation	95 °C	5 min	1																											
Denaturation	95 °C	20 sec																												
Annealing	58 °C	20 sec	30 cycles																											
Extension	72 °C	1 min																												
Final extension	72 °C	5 min	1 cycle																											
Cooling	4 °C	-	1 cycle																											
4	 <p>결과 분석</p>	<p>7. PCR 반응이 종료된 후, 반응용액을 4 - 8 °C로 유지합니다.</p> <p>8. 반응용액은 loading dye 첨가없이 전기영동을 통해 결과를 분석합니다.</p>																												

<신속진단 키트 시제품: 사용 매뉴얼>

Table 4-1. 신속진단 키트 시제품 조성

Composition		Concentration
DNA polymerase	Taq DNA polymerase	1.25 Unit / 20 μ L
Deoxynucleotide triphosphates (dNTP)	Deoxyadenosine triphosphate (dATP)	0.4 mM
	Deoxythymidine triphosphate (dTTP)	0.4 mM
	Deoxycytidine triphosphate (dCTP)	0.4 mM
	Deoxyguanosine triphosphate (dGTP)	0.4 mM
PCR buffers	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	KCl	100 mM
	MgCl ₂	3 mM
Primers	Salmo_invA_F	10 pM
	Salmo_invA_R	10 pM
	E_coli_STX2e_F	10 pM
	E_coli_STX2e_R	10 pM
	Perfringens_F	10 pM
	Perfringens_R	10 pM
	Brachyspira_F	10 pM
	Brachyspira_R	10 pM
	Lawsonia_F	10 pM
	Lawsonia_R	10 pM

4차년도 연구수행 결과 개발한 키트의 감염병 원인체 진단결과의 3차년도 연구결과와의 재현성을 검증하고자 Table 4-2 및 Table 4-3의 조건에 따라 PCR을 수행하였음. 검사 결과, 3차년도의 연구결과와 동일하게 원인체 5종의 DNA가 간섭 없이 목적하는 크기 (207, 345, 447, 598 및 777 bp)에서 증폭되었으며, 이외의 위치에서는 밴드가 나타나지 않음을 확인하였음. 이를 통하여 실제 샘플에서 여러 균주의 DNA가 혼합된 상태에서도 키트를 활용하여 각각의 특정 대상 유전자를 정확하게 증폭할 수 있음을 확인함 (Figure 4-2).

Table 4-2. 신속진단 키트 시제품의 3차년도 연구결과 재현성 검증을 위한 PCR 조성

Composition	Volume (μL)	Concentration
Salmo_invA_F	0.3	10 pM
Salmo_invA_R	0.3	10 pM
E_coli_STX2e_F	0.6	10 pM
E_coli_STX2e_R	0.6	10 pM
Perfringens_F	0.3	10 pM
Perfringens_R	0.3	10 pM
Brachyspira_F	0.6	10 pM
Brachyspira_R	0.6	10 pM
Lawsonia_F	0.6	10 pM
Lawsonia_R	0.6	10 pM
gDNA of <i>Salmonella</i>	1.0	0.8 ng
gDNA of Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>	1.0	2 ng
gDNA of <i>C. perfringens</i>	1.0	0.2 ng
gDNA of <i>B. hyodysenteriae</i>	1.0	2 ng
gDNA of <i>L. intracellularis</i>	1.0	2 ng
DW	10.2	-
Total	20.0	

Table 4-3. 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물 5종의 검출을 위한 PCR condition

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	
Annealing	58 °C	20 sec	30 cycles
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	5 min	1 cycle
Cooling	4 °C	-	1 cycle

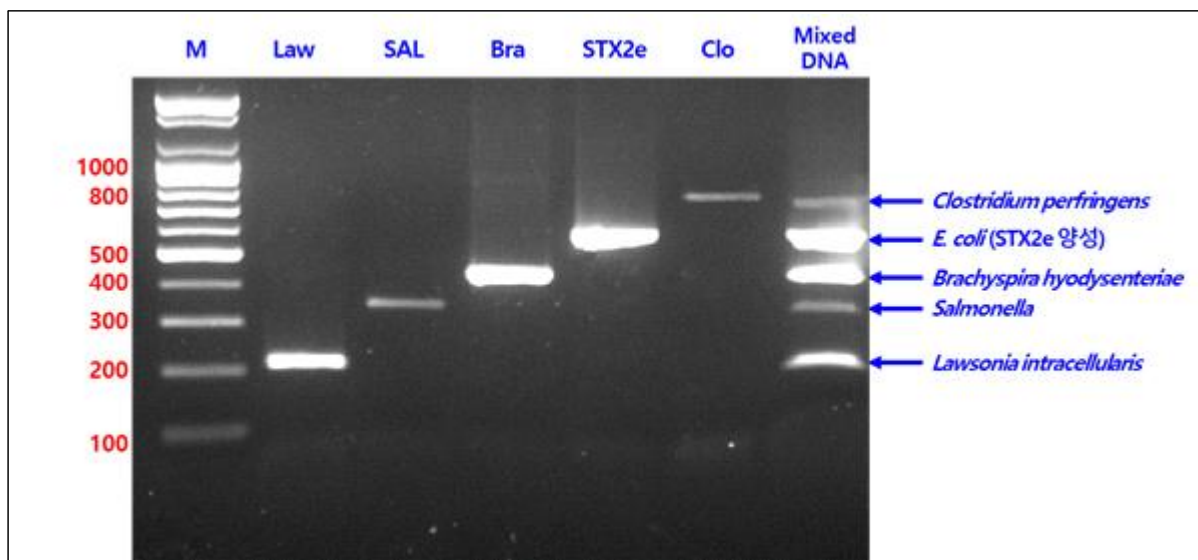


Figure 4-2. 감염병 원인체 5종 동시 검출 결과

또한 신속진단 키트의 원인체별 검출한계를 확인하기 위하여 *Lawsonia intracellularis*, *Salmonella* spp, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*의 DNA를 연속희석하고 키트를 통하여 검사하였음. 초기 DNA 양은 20 ng으로 설정하였고, 각각 1/5씩 연속

희석을 진행하였음.

그 결과, *Lawsonia intracellularis*의 DNA는 800 pg까지 검출되었으며, 그 이하의 농도에서는 검출되지 않았음(Figure 4-3). *Brachyspira hyodysenteriae*는 농도에 관계없이 0.26 pg까지 검출되었음(Figure 4-4). *Salmonella*의 경우, 1.28 pg에서 희미하게 검출되었으며, 그 이하의 농도에서는 검출되지 않았음(Figure 4-5). *Clostridium perfringens*의 경우, 0.26 pg에서 희미하게 검출되었으며, 그 이하의 농도에서는 검출되지 않을 것으로 추정됨(Figure 4-6). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 경우 32 pg까지 검출되었으며, 그 이하의 농도에서는 검출되지 않았음(Figure 4-7). 이와 같이 키트를 이용한 각 감염병 원인체의 검출한계값은 아래 Table 4-4와 같으며, 이는 미량의 시료로도 감염병 원인체를 신속하게 진단할 수 있는 기반 근거가 될 수 있음.

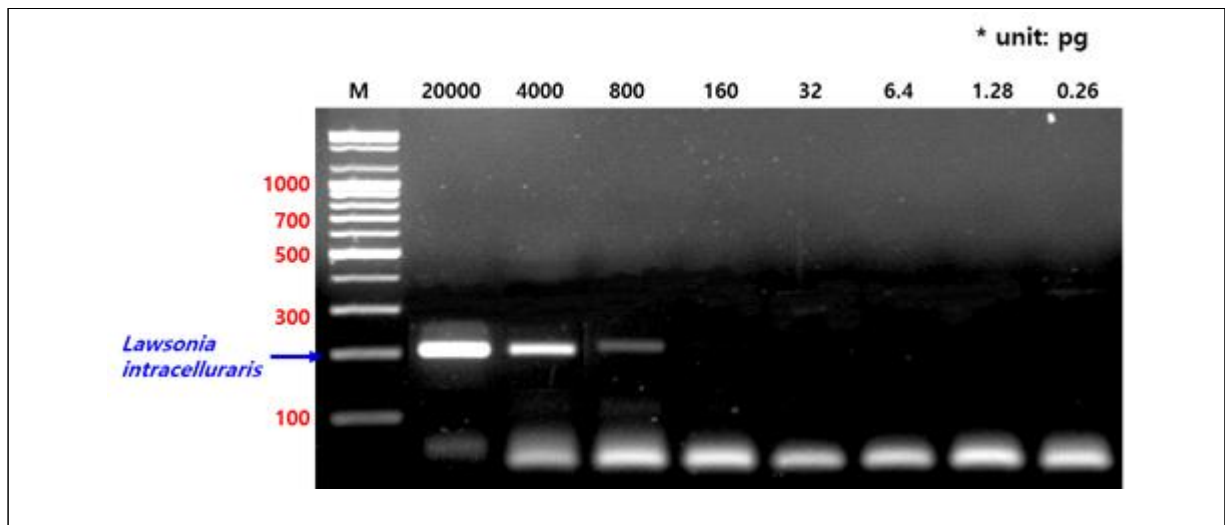


Figure 4-3. *Lawsonia intracellularis*의 gDNA농도에 따른 검출한계 PCR

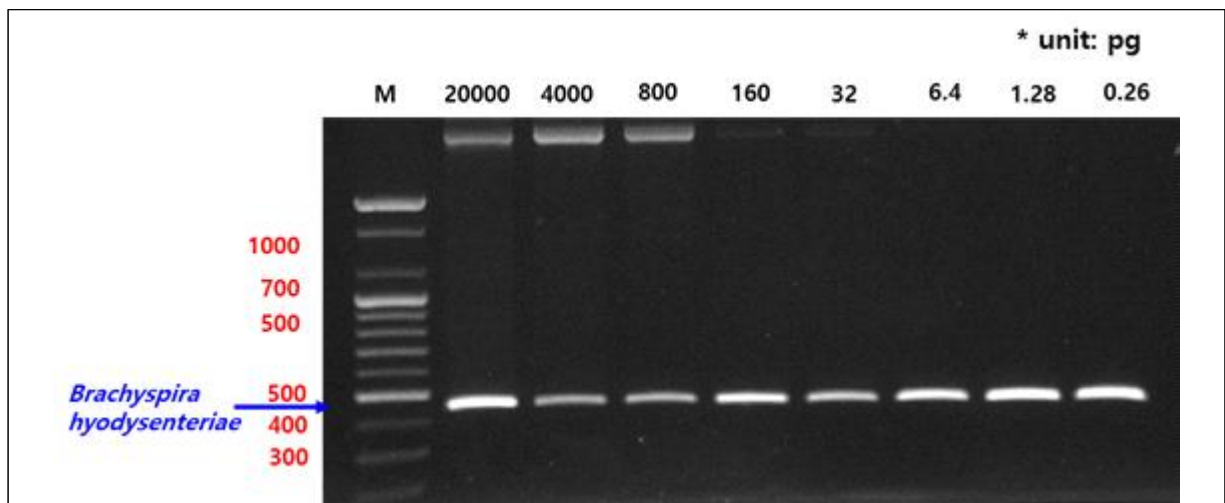


Figure 4-4. *Brachyspira hyodysenteriae*의 gDNA농도에 따른 검출한계 PCR

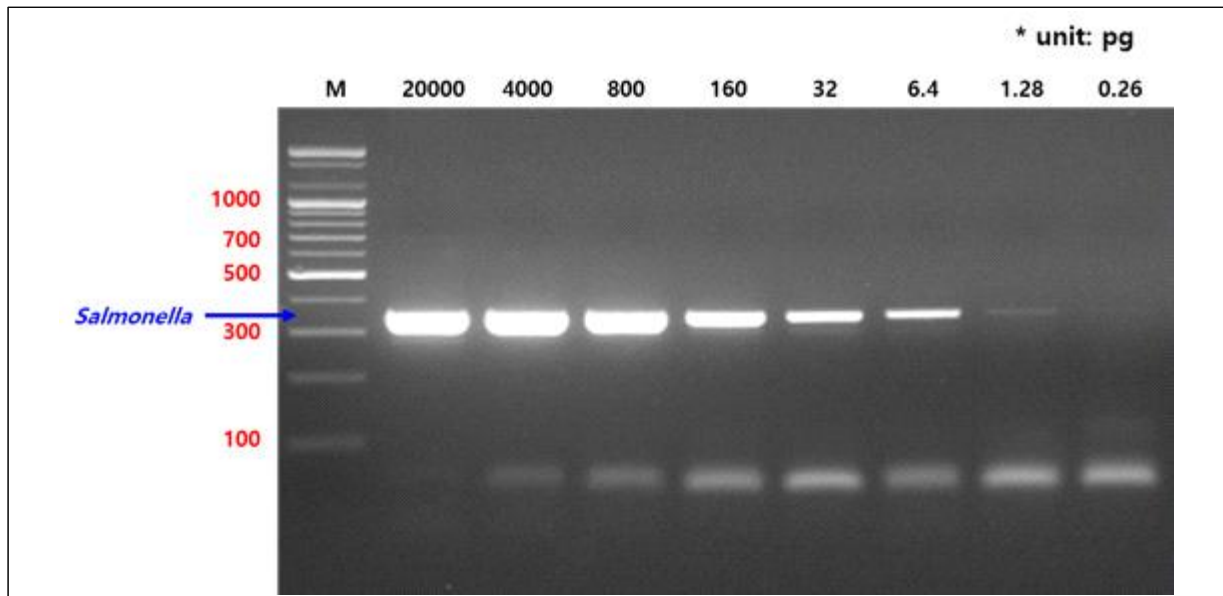


Figure 4-5. *Salmonella* spp.의 gDNA농도에 따른 검출한계 PCR

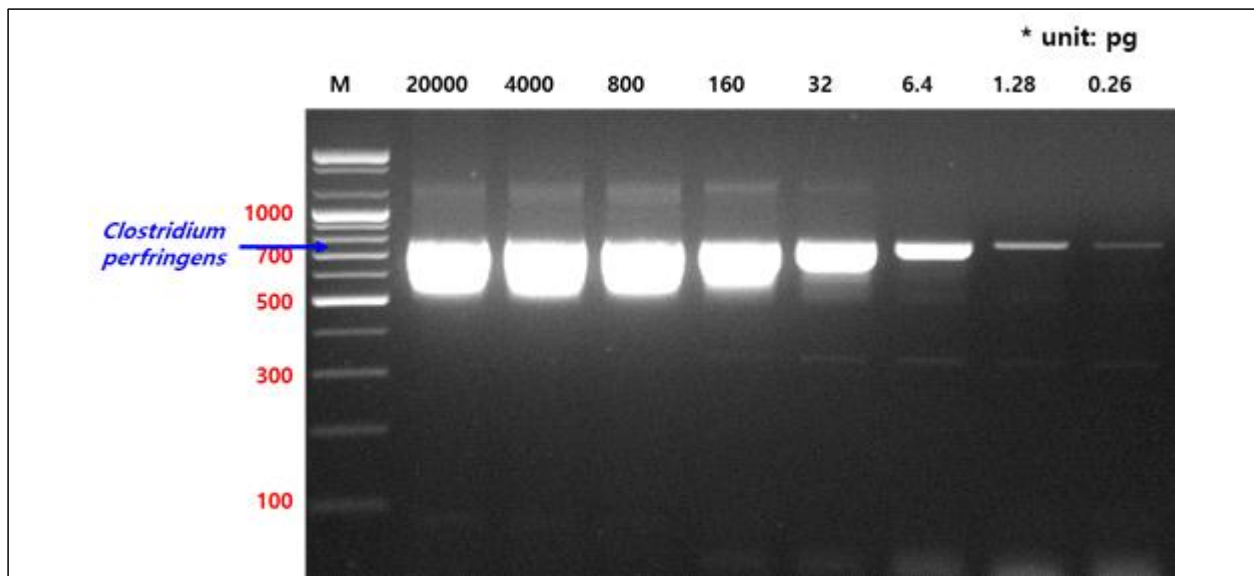


Figure 4-6. *Clostridium perfringens*의 gDNA농도에 따른 검출한계 PCR

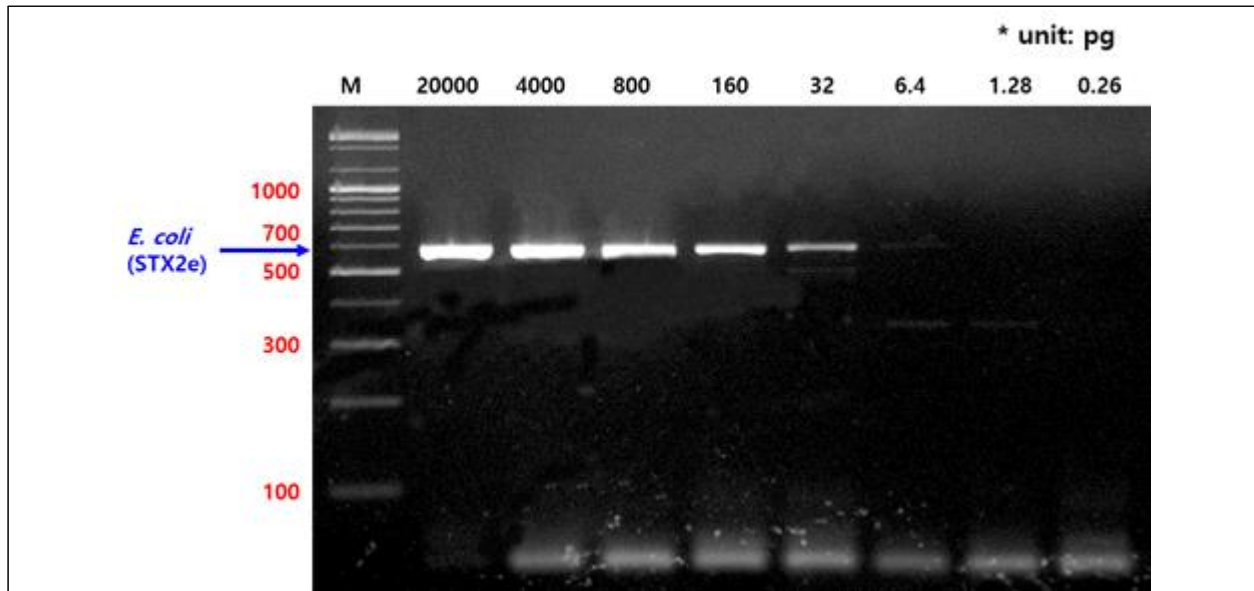


Figure 4-7. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 gDNA농도에 따른 검출한계 PCR

Table 4-4. 신속진단키트의 감염병 원인체별 검출한계농도

돼지 소화기계 주요 병원성 미생물	검출한계값
Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	32 pg
<i>Salmonella</i> spp.	1.28 pg
<i>Clostridium perfringens</i>	0.26 pg
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	< 0.26 pg
<i>Lawsonia intracellularis</i>	800 pg

2) 현장 적용 효능 평가

개발한 신속진단 키트의 현장 적용 효능을 평가하기 위하여, 국내 양돈 10개 농가를 대상으로, 수의사의 진단 하에 대장균성/살모넬라성 설사증, 장독혈증, 돈적리, 증식성 회장염 등 소화기계 감염병 환돈으로 진단된 개체의 폐사체 및 안락사 개체의 분변, 소장 및 대장 시료를 사육단계별 (포유자돈, 이유자돈, 육성돈 및 비육돈)로 채집하였음. 4차년도 연구수행 결과, 대장균증 환돈 28수, 살모넬라 감염증 환돈 21수, 장독혈증 환돈 14수, 돈적리 환돈 2수 및 증식성 회장염 환돈 2수의 분변, 소장 및 대장 시료를 확보하였음.



상기 시료를 대상으로 1차년도 계속 연구를 위하여 분변, 소장 및 대장 시료를 실험실로 무균적으로 수송하였으며, 양돈농가에 치명적인 경제적 손실을 유발하는 소화기계 감염병의 주요 병원성 원인체인 *Escherichia coli* (신생자돈 설사증, 이유자돈 설사증, 부종병 등 Colibacillosis), *Salmonella* spp. (살모넬라 감염증), *Clostridium perfringens* (장독혈증), *Brachyspira hyodysenteriae* (돈적리) 및 *Lawsonia intracellularis* (증식성 회장염)의 분리를 시도하였음.

각 병원성 세균의 분리는 농림축산검역본부의 “동물질병 표준진단요령” 가이드라인에 따라 실시하였으며, 분리된 균주는 유전자 검사(Polymerase Chain Reaction)를 통하여 최종 동정하여 추후 실험을 위하여 -80 °C에 냉동보관하였음.

분리 결과는 Table 4-5에 나타내었으며, 양돈농가에서 특히 포유자돈 및 이유자돈을 대상으로 설사, 증체불량 및 폐사 등을 유발하는 Colibacillosis의 원인체인 *Escherichia coli*는 54개 균주가 분리되었음.

*Escherichia coli*와 유사하게 황색 수양성 설사를 유발하는 *Salmonella* spp.는 총 34개 균주가 분리되었으며, PCR 및 16S sequencing을 통한 혈청형 검사 결과, Typhimurium 혈청형이 32개 검출되었으며, 혈청형이 동정되지 않은 *Salmonella* spp.가 총 2개 균주 분리되었음.

신생자돈 및 포유자돈에서 수양성 혈변을 유발하는 장독혈증의 원인체이면서 편성 혐기성 미생물인 *Clostridium perfringens*는 총 28개 균주가 분리되었음.

농장에서 체중 15 ~ 70 kg의 육성비육돈군에 집단적으로 호발하며, 상재화되는 경향이 있는 돈적리의 원인체인 *Brachyspira hyodysenteriae* 균주를 총 3개 균주를 분리하였음.

출하 전의 육성돈 및 성돈에서 타르양의 혈변을 배설하고, 빈혈을 동반하여 급속한 경과로 폐사를

유발하는 증식성 회장염의 원인체인 *Lawsonia intracellularis*는 균주가 분리되지 않았음.

Table 4-5. 돼지 소화기계 주요 병원성 미생물 유전자원 확보 현황

돼지 소화기계 감염병 감염병 원인체	이환돈수 (분리 균주 수)
대장균증(특히 부종병) <i>Escherichia coli</i>	28 (54)
살모넬라 감염증 <i>Salmonella</i> spp.	21 (34)
- <i>Salmonella</i> Typhimurium	(32)
- <i>Salmonella</i> spp.	(2)
장독혈증 <i>Clostridium perfringens</i> .	14 (28)
돈적리 <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	2 (3)
증식성 회장염 <i>Lawsonia intracellularis</i>	2 (0)

또한 상기 시료를 대상으로 신속진단 키트의 현장적용 효능을 평가/검증하기 위하여 신속진단 키트를 활용하여 감염병 원인체를 검출 및 진단함과 함께, 실험결과의 검증을 위하여 동일 시료를 가축병성 감정 전문기관에 의뢰하여 감염병을 진단하였음.

분석 결과(Table 4-6), 양돈 전문 수의사의 소화기계 감염병 진단 결과와 신속진단 키트를 활용한 검사결과간 유의미한 차이가 나타나지 않았으며, 이를 통하여 개발한 신속진단 키트가 현장에서 즉시 적용이 가능함을 확인할 수 있었음. 특히 양돈농가에 지속적인 경제적 손실을 유발하는 살모넬라 감염증 및 돈적리의 경우, 신속진단 키트에서 각각 21건 및 2건으로 검출되어 병성감정기관 (각각 20건, 1건)에 비해 높은 민감도를 나타내었으며, 이는 신속진단 키트가 *Salmonella* 및 *Brachyspira hyodysenteriae*에 대해 각각 1.28 pg 및 0.26 pg 미만의 낮은 검출 한계값을 가지고 있기 때문인 것으로 판단됨.

Table 4-6. 병성감정전문기관과 신속진단키트의 돼지 소화기계 감염병 진단 검사 결과 비교

동물 개체 등록

번호	00-000-000-0
성별	수컷
종류	개
종교	개
나이	1.5
몸무게	10
신장	150
눈색	검은색
털색	갈색

등록

[그림] 동물 개체 등록 설계

방역 진행 프로세스

1. 방역 정보

2. 방역 진행

3. 방역 완료

4. 방역 취소

5. 방역 재검

6. 방역 종료

7. 방역 해제

8. 방역 재검

9. 방역 종료

10. 방역 해제

11. 방역 재검

12. 방역 종료

13. 방역 해제

14. 방역 재검

15. 방역 종료

16. 방역 해제

17. 방역 재검

18. 방역 종료

19. 방역 해제

20. 방역 재검

21. 방역 종료

22. 방역 해제

23. 방역 재검

24. 방역 종료

25. 방역 해제

26. 방역 재검

27. 방역 종료

28. 방역 해제

29. 방역 재검

30. 방역 종료

31. 방역 해제

32. 방역 재검

33. 방역 종료

34. 방역 해제

35. 방역 재검

36. 방역 종료

37. 방역 해제

38. 방역 재검

39. 방역 종료

40. 방역 해제

41. 방역 재검

42. 방역 종료

43. 방역 해제

44. 방역 재검

45. 방역 종료

46. 방역 해제

47. 방역 재검

48. 방역 종료

49. 방역 해제

50. 방역 재검

51. 방역 종료

52. 방역 해제

53. 방역 재검

54. 방역 종료

55. 방역 해제

56. 방역 재검

57. 방역 종료

58. 방역 해제

59. 방역 재검

60. 방역 종료

61. 방역 해제

62. 방역 재검

63. 방역 종료

64. 방역 해제

65. 방역 재검

66. 방역 종료

67. 방역 해제

68. 방역 재검

69. 방역 종료

70. 방역 해제

71. 방역 재검

72. 방역 종료

73. 방역 해제

74. 방역 재검

75. 방역 종료

76. 방역 해제

77. 방역 재검

78. 방역 종료

79. 방역 해제

80. 방역 재검

81. 방역 종료

82. 방역 해제

83. 방역 재검

84. 방역 종료

85. 방역 해제

86. 방역 재검

87. 방역 종료

88. 방역 해제

89. 방역 재검

90. 방역 종료

91. 방역 해제

92. 방역 재검

93. 방역 종료

94. 방역 해제

95. 방역 재검

96. 방역 종료

97. 방역 해제

98. 방역 재검

99. 방역 종료

100. 방역 해제

[그림] 방역 진행 프로세스 설계

축산시설

시설 규모

구분	주제	면적
계축	150	73

축산 시설 정보

주소: 서울특별시 강남구 테헤란로 150-30

위도: 37.51073562803355

경도: 127.10499759629248

등록

[그림] 축산시설 지리정보 설정

- 등록된 축산시설에 대한 방역정보, 주변 축산시설에 대한 방역 정보 등을 확인할수 있는 기능 설계

방역 정보

구분	주제	면적
계축	150	73

방역 주기 설정

방역 주기: 1회

주기 입력

방역 여부 확인

방역 주기	4개월
최근 방역일	2020-04-10
상태	방역 기간 초과

방역 현황

[그림] 방역 주기 및 방역 정보 확인

3) IoT 센서 데이터 수집 및 활용기반 기능 설계

- 동물의 특이증상, 특이행동 등을 통하여 구분할 수 있는 상태에 대하여 CCTV를 활용하여 분석할 수 있는 기능 설계



[그림] 동물의 특이증상, 행동 분석 CCTV 영상

- 추가적으로 해당 데이터를 활용한 특이 증상 및 행동에 대한 패턴을 분석하여 데이터 활용 가능하도록 설계 진행

개체 정보						개체 상세 정보	
번호	ML	계급	생년월일	등록일	종류	배양인	2021-03-11 8
1	100100101	남컷	2019-03-11	1호날	돼지	배양인	돼지
2	100100102	암컷	2019-03-18	2호날	돼지	등록일	2020-09-21
3	100100103	수컷	2019-03-20	1호날	돼지	등록일	2020-09-09
4	100100104	수컷	2019-03-09	4호날	돼지	성별	수컷
5	100100105	수컷	2019-03-19	3호날	돼지	생년	1호날
6	100100106	수컷	2019-03-19	3호날	돼지	등록일	2020-09-09
7	100100107	수컷	2019-04-01	1호날	돼지	등록일	2020-09-09
8	100100108	수컷	2019-04-11	1호날	돼지	등록일	2020-09-09

[그림] 개체 정보 확인 및 데이터 활용

4) 지역방역본부 등 외부데이터 연동기능 설계

- 가축 현황 및 방역 관련 축산농장 외부 데이터 확인



- 다양한 공공 데이터를 통한 연동 기능 설계



[그림] 개체 데이터 연동 설계

5) 룰 기반 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 설계

- 동물전염병 발병 가능성 분석



[그림] 축산시설 및 전염병 발병 여부 확인

- 동물전염병 확산 예측 설계

- 돼지 번식계통 감염병 관리를 위한 병원체 핵산 추출 프로토콜 확립
 - 동물병원으로부터 샘플링한 병원체 양성 컨트롤을 활용해 체계적인 병원체 핵산 추출기법 정착
- 돼지 번식관리와 관련한 난모세포의 체외성숙시스템 개선
 - 돼지 감염성질환에서 나타날 수 있는 CCL2와 NT4와 같은 사이토카인 인자들이 돼지 난모세포의 성숙 및 번식에 미치는 분자학적 기전 분석
- 감염병에 의한 돼지 임신 중 유산과정의 시험관내 연구시스템의 기반이 되는 세포 확보
 - 인수공통 감염병 원인체로 인해 돼지 임신중 유산시 태반에 미치는 영향을 시험관내에서 분석할 수 있는 오가노이드 시스템 개발을 위해 필수적인 돼지 영양막 줄기세포의 안정적인 세포주 유지 가능여부 확인 및 단계별 특성분석 완료
- 프로그램 고도화 작업 진행
 - 현재 농가에서 관리하는 부분에 해당 프로그램을 사용하는 데 있어 필요한 사항들을 농가마다 방문하여 요구사항 수렴
 - ICT 돈사관리 시스템v1.1을 이용하여 데이터 수집 및 보관 뿐만 아니라, 농가 전체의 온도나 습도 등을 모니터링하는 IoT 센서 데이터를 추가 개발하여 기후, 발병 등의 문제 발생을 최소화하고, 전반적 돈사 관리의 편리성 증대
- 모바일 어플리케이션 개발로 인한 사용성 및 안전성 증대
 - 기존 ICT 돈사 프로그램 구축 후에 데이터 수집을 진행
 - 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 데이터를 위하여 가축의 이동 경로를 GPS로 파악할 수 있는 모바일 어플리케이션을 개발하여 발병을 예측하고 파악할 수 있는 안전성 및 사용성을 증대
- 룰 기반 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안 도출
 - 모바일 어플리케이션 관련 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안
 - 기존 GPS로 경로를 파악하는것에 더하여 해당 가축의 정보를 파악할 수 있는 데이터 구축
 - 모바일 어플리케이션 관련 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안
 - 기존 GPS로 경로를 파악하는것에 더하여 해당 가축의 정보를 파악할 수 있는 데이터 구축
 - 온/습도 및 암모니아 센서 등 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안
 - 구역마다 설치된 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 가축 생활 환경에 대한 정보를 확인할 수 있는 데이터 구축

<4차년도>

- 돈사 관리 모바일 어플리케이션 고도화 작업 진행
 - 시스템 실 사용 간에 수정 및 보완 필요기능 검토 및 추가기능 검토 진행
 - ICT 돈사관리 시스템 v1.2를 이용하여 기존의 돈사관리 시스템 내에서 개발된 온도 및 습도 모니터링 시스템을 모바일에서도 동작 가능하도록 웹/앱 시스템으로 구성하여 전반적 돈사관리의 편의성 증대
- 동물 전염병 발병 가능성 분석 및 예측 모델 고도화 진행
 - 돈사 내 수집된 온/습도 데이터 및 센서 데이터를 통하여 발병 분석 및 가축 생활 환경에 대한 정보를 확인할 수 있는 데이터 구축
 - 수식 Generator를 통하여 수집된 온/습도 빅데이터를 이용한 전염병 발병 가능성을 예측하고, 해당 예측 데이터를 통하여 예측 모델 고도화 진행
 - 예측 모델은 온/습도 및 돈사 밀집도 등을 이용하여 예측모델 구성
- 국내 보급 및 해외 추진 방안 도출

- 돈사관리 프로그램을 통하여 다수의 축사에 보급 추진 방안을 마련하여, 여러 축사 내 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 데이터화 추진 진행
- 수출 자료를 통하여 해외 축사 내 보급 추진이 가능하도록 구성하며, 프로그램 커스터마이징을 통하여 축사 이외에 적용할 수 있는 관리 프로그램 추진 진행

○ 1-1 협동

○ 국내 가금 아데노바이러스 발생현황 조사

- 2015년 가금 아데노바이러스 4형 단일 백신 출시 이후 국내 가금 아데노바이러스 발생현황 조사 전무
- 본 연구과제를 통해 2013년부터 2019년까지 의뢰되었던 국내 양계 농가 가검물 146개 분석
- 연구결과, 기존 혈청형 4형이 우세하던 국내 가금아데노바이러스 발생 현황이 혈청형 4형, 8b형, 11형이 혼재된 형태도 변화하였음을 확인
- 가금 아데노바이러스 3가 제품 개발의 과학적 근거 확보

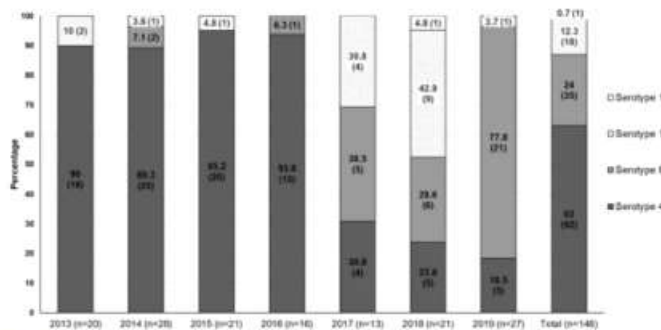


Figure 2. The annual proportion of clinical cases for each FAdV serotype from 2013 to 2019. Absolute numbers of cases are given in parentheses.

○ 국내 종계농장 가금 아데노바이러스 11형 혈청학적 유병률 조사

- 본 연구진은 경쟁제품들인 혈청형 4형, 8b형 2가 백신 대비 마케팅적 우위를 확보하고자 11형에 대한 국내 종계농장의 최근 혈청학적 유병률 조사
- 조사결과 2022-2023년, 총 90개의 농가 중 91%인 82개 농가에서 가금 아데노바이러스 11형의 야외감염을 확인
- 수직감염 방어가 중요한 가금 아데노바이러스의 특성상 종계군에 백신 접종 후 모체이행항체를 통해 후대 병아리에서의 피해를 막는 전략 사용하고 있기에 종계농장들이 가금 아데노바이러스에 얼마나 노출되어 있는지 확인한 것은 마케팅적으로 큰 의미가 있음

Seroprevalence of Fowl adenovirus type 11 in Korean breeder chicken farms from 2022 to 2023

Keungho Choi¹, Doo-Hye Park¹, Gyoung-Hye Gwon¹, Yu-Ri Kim¹, Song-Ho Yoo¹, So-Hyung Yoon¹, In-Hyuk Shim¹
¹Chang Jung BioTech Laboratory Co., Ltd., Daejeon 34023, Republic of Korea
²Animal LDC, Chungju, 24106, Republic of Korea

Introduction
 Fowl adenovirus (FAdV) is a highly contagious viral pathogen, causing poor performance and high mortality. FAdV is grouped into five species (from A to E) and further divided into 11 serotypes (1 to 11). Recent seroprevalence study showed that dominant serotypes in Korea are FAdV-4, 8, and 11. The aim of this study is to investigate the seroprevalence of FAdV-11 in Korean breeder chicken farms.

Materials & Methods
 A total of 90 breeder layer and Korean native chicken breeder farms were visited in this study. All serum samples from 2022 to the first half of 2023 were kindly provided by Avianex Ltd. Serum neutralization antibody tests were performed with FAdV-11 serotype isolated from breeder chicken farms.

Results

Table 1. Serological seroprevalence results of FAdV-11 by year

	2022	2023	Total
No. of seropositive farms	9	9	18
No. of seropositive farms	81	72	153
Prevalence rate	83%	80%	81%

Among 90 farms, 11 farms were seropositive against FAdV-11. There were no significant differences by year.

Table 2. Serological seroprevalence results of FAdV-11 by age

	<20 weeks	20-40 weeks	>40 weeks
No. of seropositive farms	7	1	0
No. of seropositive farms	10	11	17
Prevalence rate	70%	9%	0%

Number of samples from 20-40 weeks and >40 weeks were about twice obtained those of under 20 weeks. The seroprevalence of under 20 weeks was significantly lower than other groups (p-value = 0.002).

- 국내 최초 가금 아데노바이러스 3가 백신 출시 및 매출 발생
 - 2023년 3월, 국내 최초 가금 아데노바이러스 3가 백신인 “포울샷® 아데노 3가” 제조품목허가 승인 완료
 - 2023년 7월, 국내 주요 종계회사, 동물용의약품 대리점, 동물병원, 관련 매체 기자 등을 초대하여 “포울샷® 아데노 3가” 런칭 세미나 개최
 - 2023년 9월, 포울샷® 아데노 3가 국가출하승인검정 합격
 - 2023년 12월 기준 국내 매출액 1억 6천여만원 발생

○ 1-2 협동

*1차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 원인균의 분리, 동정

○ 국내 요네병 감염 개체 검사

국내 농장의 요네병 감염우의 검사는 혈청학적 방법과 분변내 균 검색 및 분리동정법을 사용하여 실시하였다. 혈청학적 검사는 ELISA test (IDEXX Lab, USA) 을 사용하여 수행하였으며, fecal PCR은 소 분변으로부터 DNA를 직접 추출하여, 요네병균 특이적 유전자인 IS900 및 ISMap02 유전자를 real-time PCR 로 검출하여 확인 하였다. Fecal PCR에서 양성인 개체들의 분변으로부터 균 분리를 수행하였다. 균 분리는 미국 동물질병진단센터(National Animal Disease Center)에서 제안한 표준 전처리 방법으로 전처리 후 VersaTREK ParaJEM system을 이용하여 수행하였다. VersaTREK에서 양성인 개체들 경우 요네병균 분리배지 (modified Herrold’s egg york medium with mycobactin J 또는 7H10 agar plate)를 사용하여 37°C에서 6 주간 배양후 특이적인 집락을 선발하였고, 이 집락의 genomic DNA 를 추출하여 PCR 검사를 통해 요네병균 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 로 확정하였다. 혈청학적 검사는 ELISA 법을 사용하였으며, 제조사 (IDEXX Lab) 측에서 제공한 시험방법에 따라 실시하였고, S/P ratio 에 따라 양성, 의양성, 음성으로 구분하였다.

○ 국내 요네병 감염 개체 검사 수행 결과

국내 요네병 감염실태를 파악하기 위하여 전국 12개 지역 1,273두의 소의 분변 PCR 및 혈청 ELISA 검사를 진행하였다. 분변 PCR 및 혈청학적 검사결과 분변내 PCR검사에서는 0.7%, 혈청학적 검사에서는 4.13%의 양성율을 나타내었다 (표 1). 분변 검사에서 양성 및 의양성을 나타낸 개체들의 분변을 VersaTREK system 및 요네병균 분리 배지를 사용하여 배양 및 PCR 기법을 통해 야외분리주로 동정하였고, 이를 통해 야외 분리주를 4주를 확보하였다.

표 1. 국내 사육소로부터 수집한 분변 및 혈청에 대한 요네병 검사결과

구 분	검사두수	양성개체수	음성개체수	양성율
fecal PCR	1,132	8	1,124	0.7%
ELISA	459	19	440	4.13%

A 목장의 각 개체별 분변 PCR 검사와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 2 와 같다.

표 2. A 목장에서 Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	X	-	3.9
2	X	-	2.7
3	X	-	2.1
4	X	-	3.2
5	X	-	1.5
6	X	-	5.5
7	X	-	2.1
8	X	-	2.2
9	X	-	40.6
10	1X	-	양성 (115.4)
11	1X	-	양성 (148.5)
12	1X	-	1.1
13	1X	-	2.7
14	1X	-	2.5
15	1X	-	1.0
16	1X	-	2.1
17	1X	-	양성 (163.3)
18	1X	-	1.3
19	1X	-	4.4
20	2X	-	2.5
21	2X	-	1.5
22	2X	-	6.9
23	2X	-	1.5
24	2X	-	42.6
25	2X	-	1.7
26	2X	-	3.7
27	2X	-	1.0
28	2X	-	1.2
29	2X	-	3.5
30	3X	-	1.6
31	3X	-	1.6
32	3X	-	0.9
33	3X	-	4.3
34	3X	-	4.0
35	3X	-	7.2
36	3X	-	6.9
37	3X	-	3.1
38	3X	-	3.1
39	3X	-	2.1
40	4X	-	2.8
41	4X	-	2.1
42	4X	-	1.8
43	4X	-	6.2

44	4X	-	5.0
45	4X	-	1.8
46	4X	-	7.7
47	4X	-	4.8
48	4X	-	2.0
49	4X	-	4.3
50	5X	-	45.8
51	5X	-	1.7
52	5X	-	2.3
53	5X	-	2.7
54	5X	-	4.8
55	5X	-	4.4
56	5X	-	2.9
57	5X	-	2.5
58	5X	-	7.8
59	5X	-	2.6
60	6X	-	1.5
61	6X	-	3.4
62	6X	-	3.5
63	6X	-	2.9
64	6X	-	1.5
65	6X	-	8.0
66	6X	-	3.6
67	6X	-	2.0
68	6X	-	3.1
69	6X	-	16.2
70	7X	-	1.7
71	7X	-	0.7
72	7X	-	1.2
73	7X	-	0.9
74	7X	-	2.5
75	7X	-	2.1
76	7X	-	2.3
77	7X	-	13.7
78	7X	-	9.8
79	7X	-	3.7
80	8X	-	11.7
81	8X	-	2.8
82	8X	-	8.6
83	8X	-	10.3
84	8X	-	3.4

2. 국내 사용 요네병 검사법에 대한 비교 검토

○ 국내 사용 요네병 혈청학적 진단법의 비교

현재 국내에서 요네병 검사를 위해 사용하고 있는 혈청학적 진단법의 각각의 장, 단점을 가지고 있어 이들 두가지 ELISA 법 [Kit A (IDEXX Lab, USA), Kit B (IDvet innivative, France) 의 상호비교와 이들 개체의 분변내 균 (real-time PCR) 검출법을 상호 비교하여 소 요네병에 대한 효율적인 검사방법을 확립하고자 하였다.

두가지 ELISA kit 간 결과 비교 및 fecal PCR과의 일치도를 비교한 결과 두가지 혈청학적 검사 방법인 kit A와 kit B 사이에는 비교적 높은 일치도를 보였다. 그러나, 두가지 방법간에 위양성 (false positive) 과 위음성 (false negative) 를 보이는 개체들이 있어서 이들의 효율적인 검출을 위해서는 두 kit를 상호 보완적으로 사용한 요네병 혈청학적 진단의 적용이 필요하다고 판단된다 (그림 1).

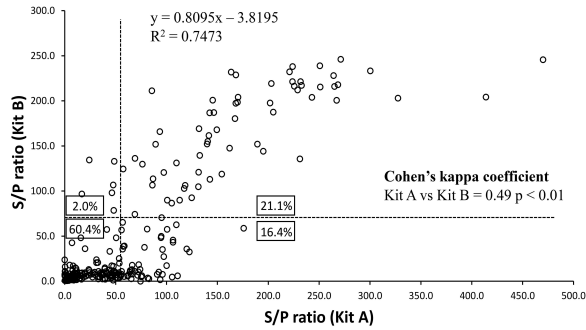


그림 1. 요네병 혈청학적 진단법 Kits A와 B간의 비교

요네병의 혈청학적 검사결과와 소 분변내 PCR 검사결과를 비교 분석한 결과 fecal PCR 검사와 혈청학적 검사결과간의 일치율은 낮아다 (표 3). 이들간의 상관관계를 소의 연령대별로 분석한 결과 연령대가 낮은 개체에서는 fecal PCR에서 양성율이 높았고, 연령대가 높은 개체에서는 혈청학적 양성율이 높았다 (그림 2).

표 3. Kit A 와 B 을 이용한 혈청학적 검사결과와 분변내 균 검색법의 비교

Fecal PCR	ELISA				Total
	Both positive	Kit A only	Kit B only	Both negative	
Positive	25	2	2	31	60
Negative	37	43	4	127	211
ND	1	4	0	22	27
Total	63	49	6	180	298

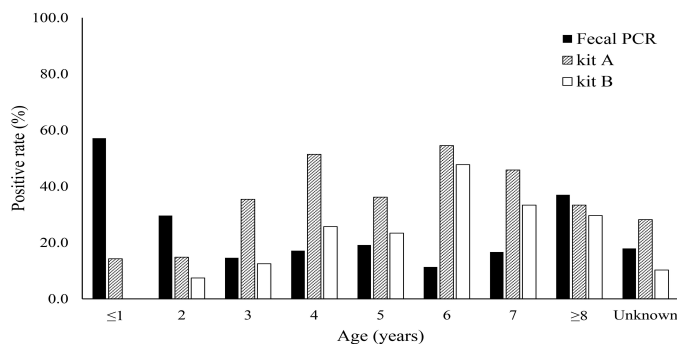


그림 2. Fecal PCR 및 혈청학적 검사결과 연령별 양성율

위 결과를 종합하여 볼때에 소 요네병의 주요 감염원인 준임상형 균배출우 (subclinical fecal shedder) 을 효율적으로 검출하고, 농장내 요네병 근절을 위해서는 fecal PCR 및 혈청학적 검사인 ELISA 기법을 상호 보완적으로 사용되어야 하며 연속적인 검사로 양성 개체를 지속적으로 검출, 도태시키는 것이 소 요네병 근절을 위한 필수적이라고 생각한다.

3. 국내 소 류코시스 감염실태 조사

- 소 류코시스는 국가의 가축전염병 중 중점관리 대상 밖에 있어 정확한 감염실태에 대한 조사가 없었고, 젓소에서 40~50% 정도 감염되어 있을 것으로 추정 되어진다.
- 소 류코시스의 검사는 전통적으로 AGID법(Agarose gel immuno-diffusion법)을 이용하여 진단하였

으나, 결과판정의 문제 등으로 인해 현재는 혈청 ELISA법에 의한 항체가 측정이 일반적으로 진단에 사용되고 있다.

• 그러나 소 류코시스에 이환된 소에는 Lymphocyte 수의 증가가 나타나므로 이러한 수치를 신속 진단에 이용하기도 한다. 즉, CBC(Complete blood cell count) 검사만으로 소 류코시스의 검사가 가능하다면 ELISA검사보다 쉽고 신속하게 진단이 가능할 수 있다. 이에 따라 CBC 검사를 통해 소 류코시스 이환 의심개체를 선별하여 해당 샘플에 대한 ELISA검사를 실시하고, 이 두가지 검사에 대한 일치도를 확인하였다.

• 2020년 11월까지 젓소목장 12개소 446두, 한우목장 10개소 158두에서 혈액 샘플링을 실시하여 CBC 검사를 완료하였다.

구분	검사두수	양성개체수	음성개체수	양성율
젓소	446	105	341	23.5%
한우	158	3	155	1.9%
총	604	108	496	17.9%

[CBC 검사를 이용한 소 류코시스 이환 의심 개체 선별]

※ 2차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

국내 사육 소 농장에서 요네병을 검색하기 위해 국내 6개의 도에서 142개 소 분변과 119점의 혈청을 수집하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 소 분변 및 혈청의 검사는 1차년도와 동일한 방법으로 실시하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP 의 분리, 동정을 실시하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

총 153두의 소에서 채취한 142개 분변 샘플, 119점의 혈청 샘플에서 진단검사를 진행하여 각각 분변에서 5두 (3.5%), 혈청에서 3두 (2.5%)에서 국내 사육 소의 요네병 양성을 확인하였다 (표 4). 이중 1두는 분변과 혈청에서 모두 양성을 나타내었다.

표 4. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
양성	5	3
음성	137	116

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 5 와 같다.

표 5. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단 검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	2X	-	3.3
2	4X	-	8.8
3	5X	-	2.3
4	6X	-	3.7
5	9X	-	51.3
6	1X	-	양성 (138.3)
7	1X	-	2.3
8	2X	-	11.0
9	2X	-	1.2
10	2X	-	6.8
11	2X	-	1.9
12	2X	-	0.7
13	2X	-	1.2
14	3X	-	6.5
15	3X	양성	3.1
16	3X	-	1.6
17	3X	-	4.5
18	3X	양성	양성 (75.7)
19	3X	-	10.3
20	3X	-	7.9
21	3X	-	4.4
22	4X	-	1.9
23	4X	-	3.4
24	4X	-	2.4
25	4X	-	8.6
26	4X	-	21.6
27	5X	-	4.6
28	5X	-	43.6
29	5X	-	2.7
30	5X	-	1.1
31	5X	-	15.2
32	5X	-	5.6
33	5X	-	양성 (154.3)
34	5X	-	8.2
35	6X	-	16.8
36	6X	-	2.5
37	6X	-	13.0
38	6X	-	3.5
39	6X	-	7.7
40	6X	-	3.4
41	6X	-	2.8
42	6X	-	2.6
43	6X	양성	10.0
44	6X	-	5.1
45	7X	-	3.3
46	7X	-	4.9
47	7X	-	2.3
48	7X	-	6.8
49	7X	-	5.6
50	7X	-	2.7
51	7X	-	1.7
52	7X	-	1.5

53	7X	양성	-
54	8X	-	5.3
55	8X	-	2.5
56	8X	-	5.1
57	8X	-	4.0
58	8X	-	12.8
59	8X	-	8.8
60	8X	-	5.7
61	8X	-	5.1
62	8X	-	6.3
63	8X	-	8.2
64	9X	-	15.8
65	9X	-	9.8
66	9X	-	10.4
67	9X	-	2.7
68	9X	-	3.6
69	9X	-	3.6
70	9X	-	3.8
71	9X	-	15.2
72	9X	-	6.5
73	9X	-	5.7
74	10X	-	5.3
75	SFXX	양성	32.9
76	2X	-	-
77	SFXX	-	-
78	5X	-	-
79	15XX 602XX	-	2.8
80	15XX 603XX	-	2.9
81	15XX 580XX	-	3.2
82	15XX 632XX	-	2.8
83	15XX 228XX	-	3.2
84	15XX 430XX	-	2.9
85	15XX 495XX	-	9.4
86	15XX 734XX	-	9.4
87	15XX 736XX	-	9.9
88	15XX 736XX	-	2.9
89	15XX 738XX	-	8.6
90	16XX 913XX	-	2.7
91	22XX	-	6.5
92	43XX	-	10.9
93	49XX	-	14.2
94	58XX	-	25.8
95	60XX	-	42.6
96	60XX	-	8.1
97	63XX	-	30.3
98	73XX	-	7.3
99	73XX	-	1.1
100	73XX	-	0.9
101	91XX	-	3.6
102	15XX 303XX	-	-
103	15XX 280XX	-	-
104	15XX 021XX	-	-
105	15XX 021XX	-	-
106	15XX 718XX	-	-
107	15XX 529XX	-	-
108	15XX 470XX	-	-
109	15XX 734XX	-	-

110	156XX 607XX	-	-
111	15XX 88XX	-	-
112	15XX 207XX	-	-
113	15XX 470XX	-	-
114	15XX 529XX	-	-
115	15XX 528XX	-	-
116	15XX 608XX	-	-
117	15XX 101XX	-	-
118	15XX 248XX	-	-
119	15XX 144XX	-	-
120	15XX 216XX	-	-
121	15XX 443XX	-	-
122	15XX 017XX	-	-
123	15XX 864XX	-	-
124	15XX 490XX	-	-
125	15XX 203XX	-	-
126	15XX 528XX	-	-
127	15XX 756XX	-	-
128	15XX 607XX	-	-
129	15XX 448XX	-	-
130	15XX 420XX	-	-
131	15XX 206XX	-	-
132	46XX	-	14.8
133	23XX	-	7.4
134	43XX	-	6.7
135	46XX	-	16.9
136	29XX	-	13.8
137	46XX	-	5.4
138	29XX	-	18.5
139	43XX	-	6.5
140	40XX	-	22.6
141	46XX	-	8.0
142	46XX	-	5.6
143	47XX	-	10.1
144	23XX	-	6.4
145	22XX	-	8.9
146	22XX	-	33.5
147	46XX	-	7.9
148	46XX	-	4.3
149	46XX	-	0.8
150	05XX	-	5.1
151	40XX	-	11.4
152	46XX	-	6.2
153	05XX	-	3.0

○ 국내 사육 소의 감염실태 및 역학적 특성 조사 결과

경기도, 충청도, 강원도, 전라도, 경상도 등지에 분포한 총 153마리의 소에서 채취한 142개 분변 가검물, 119점의 혈청 가검물에 대한 요네병 검사 결과의 지역 분포를 분석한결과 분변 가검물 및 혈청 가검물 모두 강원도에서 수집한 가검물에서 양성개체를 확인 하였다 (표 6).

표 6. 국내 사육 소 요네병 진단검사 지역 분포

	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
경기도	25	25
충청북도	27	19
충청남도	26	22
강원도	50 (양성 5)	50 (양성 3)
전라남도	11	-
경상남도	3	3

각 지역에서 수집한 분변 및 혈청가검물에 대한 소 요네병검사결과를 연령별로 분석한 결과 분변에서는 모두 약 2.5년 이상의 소에서 검출되었다 (표 7).

표 7. 국내 사육 소 요네병 진단검사 연령 분포

개월령	검사 두수 (n=153)	
	분변 (n=142)	혈청 (n=119)
1 - 10	44	44
11 - 30	33	25
31 - 50	10 (양성 1)	10
51 - 70	30	15
71 - 90	15(양성 2)	15 (양성 2)
91 -	10 (양성 2)	10 (양성 1)

2. miRNA를 이용한 요네병 조기진단을 진단법 개발

소 요네병의 주요 감염원인 준임상형 분변배출 개체 (subclinical fecal shedder) 의 조기검출기법을 개발하기 위하여 혈청내 miRNA 분석을 실시하였다. 이를 위하여 본 연구실에서 2013년부터 실험시 (2019년)까지 요네병 진단을 위해 국내 농장으로부터 수집한 분변 (271개) 및 혈청 가검물 (298개)을 이용하여 fecal PCR 법, ELISA 법 및 임상증상 등을 바탕으로 감염단계를 구분하였다. 감염단계는 4 group (A group: PCR, ELISA 양성, 임상증상 있음, B group: PCR, ELISA 양성, 임상증상 없음, C group: PCR양성, ELISA음성, 임상증상 없음, D group; PCR, ELISA 및 임상증상 음성) 으로 구분하였고, 단계별 혈청 샘플들의 miRNA를 추출하여 음성그룹 대비 감염그룹의 miRNA 염기서열 분석을 통해서 차등발현되는 miRNA를 확인하였다. 이들중 음성 그룹 대비 모든 감염그룹에서 2배이상 ($|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$)차등발현된 miRNA를 발현값을 기준으로 하여 biomarker 후보들을 선별 하였다.

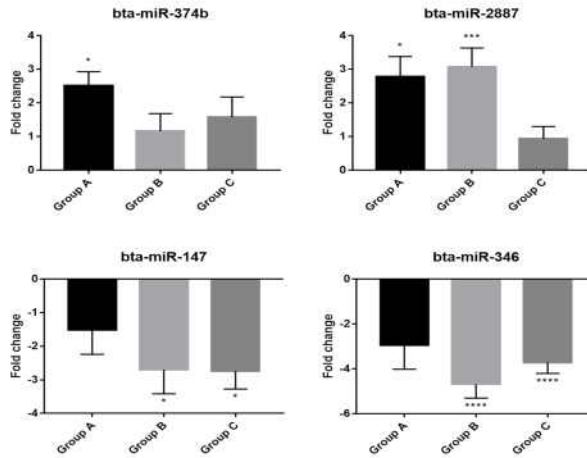


그림 4. 요네병 감염군의 후보 miRNA에 대한 유전자 발현량 확인

3. Microbiome 분석을 통한 요네병 잠복감염개체검출을 위한 진단법 개발

○ 요네병 미감염우, 동거우, 감염우 간 미생물 균총 분석

소 요네병균의 잠복개체를 효율적으로 검출하기 위한 예측모형을 개발하기 위하여 소 분변내 microbiome 분석을 실시하였다. 이를 바탕으로 기존연구결과를 종합하여 machine-learning 기법을 통하여 소 분변내 microbiome 의 분포의 분석으로 요네병 잠복감염개체를 검출하는 기법을 개발하고자 하였다.

장내 균총 파이프라인을 구축하고 이를 업데이트하면서 미감염우와 감염우에 대한 기본적인 장내 균총 양상 파악을 진행하였음. 확보된 소 유래 분변 샘플로부터 16S rRNA 시퀀싱 데이터를 생성하여 분석에 활용하고자 하였으며, 유의미한 지표를 발굴하기 위해 MAP 감염에 민감하게 반응하는 주요 미생물들을 선별하는 과정과 ELISA s/p ratio나 fecal PCR 결과 등 기존의 진단 방식의 결과값을 통합하여 분석을 진행하였다.

즉, 샘플의 특성을 정리한 메타데이터 파일 생성, 장 내 균총 분석에 특화된 파이프라인을 활용한 미생물 군집 분석, 자체 제작한 알고리즘 등을 활용한 추가 분석의 단계로 진행되었음 (그림 5). 분석에 사용된 샘플은 총 52개 (감염우: 22, 동거우: 10, 미감염우: 20)로써 장 내 균총 분석용 파이프라인은 가장 널리 사용되며 정확성을 가지고 있다고 알려진 QIIME2를 활용하여 α -diversity, β -diversity, 그리고 생물군 분류 지정 (taxonomy assignment)을 진행함. 이후 추가적으로 미생물 분류 단위인 ASV (amplicon sequence variant)의 상대적 풍부도(relative abundance) 값을 활용한 다양한 추가 분석과 PICRUSt2를 활용한 집단유전체 예측 등을 통해 특성을 파악하고자 하였다.

MAP 감염 유무, 감염우와의 동거 유무, ELISA 혹은 fecal PCR 결과 등 샘플 별 특성에 따라 아그룹화(subgrouping) 및 통계적 분석을 진행할 수 있도록 메타데이터를 생성하였다 (표 9). 동일 개체 인데 식별번호가 바뀐 경우에는 이를 혼동하지 않기위해 1차 샘플링 시 식별번호에 2차 샘플링은 “.2”, 3차 샘플링은 “.3” 등으로 표기를 바꾸어 분석을 진행하였다.

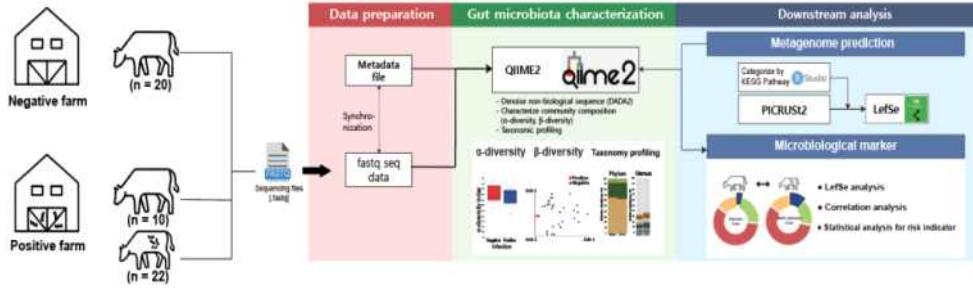


그림 5. 총 52개 샘플을 활용한 장내균총 분석 모식도

표 9. 샘플 별 특성을 반영한 메타데이터

Sample ID	Infection result	Subgroup	ELISA s/p ratio	MAP_CFU (Fecal PCR)	Sampling	Farm	Lactation	Parity	Cow type	Age (yr)
23	Negative	Co-housing_negative	6.8	-	2021	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	6
28	Negative	Co-housing_negative	0.7	-	2021	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
33	Negative	Co-housing_negative	1.6	-	2021	PositiveFarm	Dry	3	Dairy	7
38	Negative	Co-housing_negative	7.9	-	2021	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	6
41	Negative	Co-housing_negative	1.9	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	6
42	Negative	Co-housing_negative	3.4	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	5
50	Negative	Co-housing_negative	4.6	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	5
61	Negative	Co-housing_negative	2.5	-	2021	PositiveFarm	Dry	1	Dairy	4
81	Negative	Co-housing_negative	2.5	-	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	4
8221	Negative	Co-housing_negative	5.1	-	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
neg_123	Negative	Negative-farm	3.952976	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	3	Dairy	5
neg_157	Negative	Negative-farm	5.775165	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_196	Negative	Negative-farm	6.127847	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_198	Negative	Negative-farm	8.875827	-	2019	NegativeFarm	Gestation	1	Dairy	4
neg_226	Negative	Negative-farm	1.932403	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Dairy	3
neg_228	Negative	Negative-farm	6.436444	-	2019	NegativeFarm	Gestation	1	Dairy	3
neg_229	Negative	Negative-farm	4.188097	-	2019	NegativeFarm	Gestation-miscarriage	1	Dairy	3
neg_23	Negative	Negative-farm	10.76414	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	4	Dairy	3
neg_38	Negative	Negative-farm	2.902278	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	5
neg_81	Negative	Negative-farm	4.665687	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	2	Dairy	4
neg_K10	Negative	Negative-farm	9.448935	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	3	Hanwoo	5
neg_K15	Negative	Negative-farm	44.14401	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K19	Negative	Negative-farm	8.412932	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	0	Hanwoo	3
neg_K25	Negative	Negative-farm	7.435709	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K28	Negative	Negative-farm	2.828802	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	3
neg_K29	Negative	Negative-farm	4.35709	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K31	Negative	Negative-farm	6.252755	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	1	Hanwoo	3
neg_K33	Negative	Negative-farm	5.892726	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	2
neg_K34	Negative	Negative-farm	3.357825	-	2019	NegativeFarm	Gestation	0	Hanwoo	2
neg_K8	Negative	Negative-farm	3.196179	-	2019	NegativeFarm	Unknown-negfarm	4	Hanwoo	5
134	Positive	Positive	57.5	2.46E+07	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	8
167	Positive	Positive	76.4	-	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
167.2	Positive	Positive	40.6	-	2020	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
167.3	Positive	Positive	51.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	8

168	Positive	Positive	7.6	8.03E+00	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
168.2	Positive	Positive	115.4	-	2020	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	7
181	Positive	Positive	148.5	-	2020	PositiveFarm	Dry	4	Dairy	7
181.2	Positive	Positive	20	-	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	3
181.3	Positive	Positive	138.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	5	Dairy	8
188	Positive	Positive	175.9	1.01E+05	2019	PositiveFarm	Lactation	4	Dairy	5
188.2	Positive	Positive	2.7	-	2020	PositiveFarm	Dry	4	Dairy	6
202	Positive	Positive	93.4	1.10E+03	2019	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	4
202.2	Positive	Positive	163.3	-	2020	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	5
224	Positive	Positive	2.4	4.95E+02	2019	PositiveFarm	Dry	2	Dairy	5
237	Positive	Positive	3.4	5.72E+02	2019	PositiveFarm	Dry	1	Dairy	3
32	Positive	Positive	3.1	4.09E+03	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	6
35	Positive	Positive	75.7	6.71E+04	2021	PositiveFarm	Lactation	3	Dairy	6
58	Positive	Positive	154.3	-	2021	PositiveFarm	Lactation	2	Dairy	4
68	Positive	Positive	10	1.14E+02	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
79	Positive	Positive	0	6.46E+03	2021	PositiveFarm	Lactation	1	Dairy	3
8219	Positive	Positive	0.1	6.74E+03	2019	PositiveFarm	Lactation	5	Dairy	8
97	Positive	Positive	1.2	1.86E+02	2019	PositiveFarm	Dry	5	Dairy	8

가장 우선적으로 MAP 감염 유무에 따른 α -diversity, β -diversity 지표들의 변화를 통해 장 내 균총 변화양상을 확인해봄. 먼저 α -diversity는 미생물 군집의 균등도(evenness), 풍부도(richness), 그리고 다양성 (diversity)을 나타내는 여러 지표들을 통해 군집 내 개체 별 특성을 파악하였다 (그림 6). 흥미롭게도, 살펴본 5가지 지표 모두 MAP 감염군이 유의적으로 더 낮은 것을 확인하였다. 일반적으로 3가지 항목이 모두 높을수록 건강한 장내균총이라고 여겨지기 때문에 MAP 감염이 소의 장 내 균총에 악영향을 주었다는 것을 알 수 있었다.

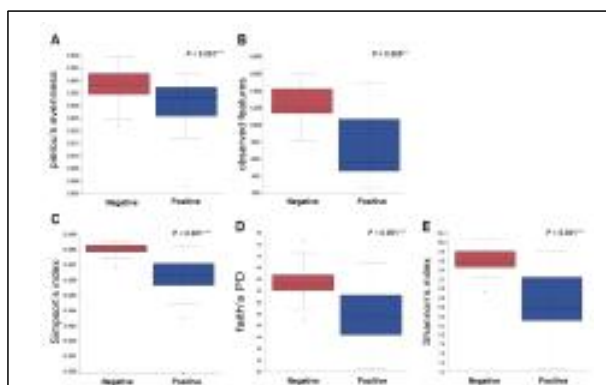


그림 6. MAP 감염 유무에 따른 α -diversity 지표의 변화 (A) Pielou's evenness (균등도), (B) observed features (풍부도), (C-E) Simpson's index, Faith's PD, Shannon's index (이상 다양성)

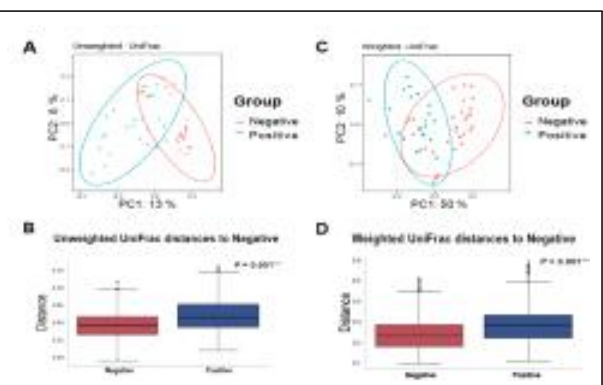


그림 7. MAP 감염 유무에 따른 β -diversity 지표의 변화 (A-B) 비가중 군간 유사거리 기반 PCoA plot (A)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (B), (C-D) 가중 군간 유사거리 기반 PCoA plot (C)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (D)

다음으로는, 샘플 간 차이를 확인하기 위해 β -diversity 지표 중 비-/가중 군간 유사거리 (un-/weighted UniFrac distance)를 이용한 PCoA (principal coordinates analysis) plot을 그려 시각화하였다 (그림 7). 이 때 그룹 간 차이 확인이 용이하도록 감염군 (Positive, 파랑) 과 대조군 (Negative, 빨강)의 색깔을 다르게 라벨링하였고, 95% 신뢰타원을 표시함 (그림 7A). 또한 대조군의 중심점(centroid)으로부터 각 샘플의 거리를 상자 그래프화하고 그 통계적 유의성(Mann-Whitney U test)을 파악하였음 (그림 7B). 결과적으로, 두 가지 지표 모두 PCoA plot에서도 그룹에 따라 군집화

(clustering)이 일어나며 통계적으로도 유의적인 차이가 있었다. 즉, MAP 감염이 장내 균총의 변화를 명백하게 유도하였다는 것을 뜻함.

MAP 감염이 개별 미생물에 미치는 미시적 영향을 파악하기 위해 각 미생물의 상대적 풍부도 값 정보를 기반으로 통계 분석 등을 진행하여 각 그룹에서 유의적으로 풍부한 미생물들 (감염군: 파랑, 대조군: 빨강)을 파악할 수 있었다 (그림 8). 또한, 각각의 값들은 ELISA s/p ratio 및 fecal PCR 결과와의 상관관계 분석, MAP 감염에 민감하게 반응하는 미생물을 선별하는 feature로써 활용하는 등 최종적인 지표 개발에 적극 활용할 수 있을것으로 판단하였다.

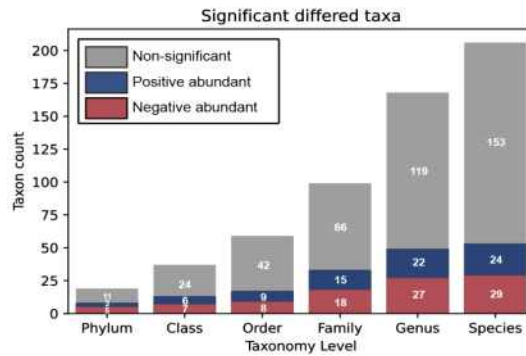


그림 8. 생물군 수준별 유의미한 변화가 확인된 미생물 분포

※ 3차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

국내 사육 소 농장에서 요네병을 검색하기 위해 188개 소 분변과 165점의 혈청을 수집하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 분변 및 혈청가검물은 1, 2년차와 동일한 방법으로 검사를 수행하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP의 분리, 동정을 실시하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

3년차 소 요네병 검사를 위하여 총 188두의 소로부터 분변 (188개) 과 혈청 (165개)을 채취하여 요네병에 대한 진단검사를 실시한 결과 분변에서 9두 (4.8%), 혈청에서 5두 (3.0%)가 양성을 보였다 (표 10). 분변에서 양성을 보인 개체에서는 1, 2년차에서 시행한 것과 같은 방법으로 MAP의 분리, 동정을 실시하였다.

표 10. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=188)	
	분변 (n=188)	혈청 (n=165)
양성	9	5
음성	179	160

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio 는 아래의 표 11 과 같다.

표 11. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	20XX	-	4.6
2	80XX	양성	양성 (71.4)
3	10XX	양성	10.8
4	76XX	-	10.0
5	81XX	-	8.5
6	24XX	-	3.8
7	30XX	-	3.5
8	30XX	-	2.9
9	30XX	-	5.9
10	80XX	-	3.3
11	49XX	-	1.6
12	07XX	-	3.4
13	06XX	-	5.4
14	16XX	-	1.2
15	130XX	-	4.9
16	F16XX	-	1.4
17	J16XX	-	2.6
18	F16XX	-	1.4
19	160XX	-	3.2
20	161XX	-	7.1
21	130XX	양성	2.8
22	J16XX	-	1.0
23	F16XX	-	4.2
24	160XX	-	3.6
25	160XX	-	20.9
26	34XX	-	20.1
27	25XX	-	2.0
28	83XX	-	1.9
29	14XX	-	1.9
30	45XX	-	3.2
31	39XX	-	4.5
32	53XX	-	1.8
33	49XX	-	2.0
34	91XX	-	1.4
35	80XX	-	3.8
36	04XX	-	7.7
37	02XX	-	2.6
38	20XX	-	1.8
39	20XX	-	4.7
40	06XX	-	3.0
41	12XX	-	20.9
42	24XX	-	2.28
43	29XX	-	2.4
44	98XX	-	1.2
45	33XX	-	3.7
46	41XX	-	20.1
47	43XX	-	2.5
48	59XX	-	1.8
49	67XX	-	6.4
50	92XX	-	9.1
51	SFXX	양성	1.3
52	160XX	-	-
53	170XX	-	-
54	160XX	-	-

55	180XX	-	-
56	170XX	-	-
57	170XX	-	-
58	F16XX	-	-
59	170XX	-	-
60	170XX	-	-
61	F16XX	-	-
62	170XX	-	-
63	J17XX	-	-
64	160XX	-	-
65	130XX	-	-
66	F16XX	-	-
67	210XX	-	-
68	160XX	-	-
69	180XX	-	-
70	F16XX	-	-
71	180XX	-	-
72	170XX	-	-
73	140XX	-	-
74	160XX	-	-
75	170XX	-	1.8
76	210XX	-	1.2
77	160XX	-	7.1
78	160XX	-	6.4
79	J17XX	-	3.8
80	170XX	-	2.4
81	170XX	-	1.2
82	180XX	-	7.1
83	160XX	-	8.5
84	160XX	-	3.7
85	36XX	-	2.7
86	36XX	-	16.9
87	25XX	-	3.1
88	39XX	-	4.0
89	27XX	-	1.6
90	97XX	-	6.4
91	66XX	-	3.0
92	44XX	-	1.4
93	44XX	-	15.0
94	13XX	-	4.5
95	32XX	-	0.8
96	53XX	-	6.4
97	68XX	-	1.3
98	41XX	-	23.3
99	88XX	양성	1.8
100	44XX	-	2.0
101	43XX	-	2.6
102	31XX	-	1.5
103	59XX	-	0.8
104	09XX	-	7.5
105	29XX	-	10.2
106	70XX	-	15.0
107	71XX	-	8.4
108	13XX	-	1.5
109	31XX	-	0.1
110	41XX	-	4.3
111	43XX	-	0.4

112	44XX	-	0.1
113	53XX	-	18.3
114	59XX	-	6.6
115	68XX	-	0.1
116	39XX	-	1.1
117	39XX	-	1.9
118	93XX	-	1.3
119	43XX	-	1.1
120	43XX	-	0.7
121	43XX	-	1.2
122	93XX	-	1.0
123	95XX	-	1.9
124	40XX	-	1.6
125	93XX	-	17.1
126	40XX	-	2.8
127	37XX	-	1.9
128	95XX	-	8.3
129	95XX	-	0.9
130	39XX	-	4.5
131	42XX	-	2.4
132	43XX	-	3.6
133	43XX	-	2.4
134	93XX	-	9.2
135	42XX	-	3.8
136	43XX	-	1.0
137	95XX	-	1.6
138	95XX	-	1.5
139	39XX	-	2.5
140	43XX	-	3.4
141	43XX	-	4.2
142	39XX	-	0.9
143	40XX	-	2.9
144	43XX	-	5.1
145	42XX	-	2.3
146	13XX	-	2.7
147	31XX	-	0.8
148	41XX	-	6.0
149	43XX	-	0.7
150	44XX	-	1.1
151	44XX	-	11.0
152	53XX	-	4.4
153	59XX	-	0.5
154	68XX	-	1.3
155	SFXX	양성	양성 (148.6)
156	F16XX	-	35.2
157	210XX	-	37.8
158	160XX	양성	양성 (57.3)
159	210XX	-	28.8
160	140XX	-	27.3
161	210XX	-	5.0
162	210XX	-	2.7
163	21XX	-	1.6
164	16XX	-	5.1
165	140XX	-	6.4
166	210XX	-	3.7
167	F16XX	-	7.2
168	09XX	-	1.6

MAP 감염과 연관있는 미생물들을 LDA 분석과는 독립적인 방식으로 확인하기 위해서, 각 개체 별 ELISA S/P ratio 및 fecal PCR 결과값들과 미생물 풍부도값 간에 상관관계 분석 (Spearman correlation analysis)을 진행하였다. 이를 바탕으로 ELISA S/P ratio의 경우 상관관계를 가지는 미생물들이 선정하였다 (표 12).

표 12. ELISA S/P ratio 값과 상관관계를 보이는 미생물 분류군

Taxonomy (Total num)	Type	Bacteria	Coefficient (ρ)	P
Phylum (19)	Positive-correlated	Firmicutes	0.723	1.38E-09
		Actinobacteria	0.717	2.25E-09
		Euryarchaeota	0.636	3.96E-07
	Negative-correlated	Bacteroidetes	-0.638	3.68E-07
		Unassigned phylum of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Class (37)	Positive-correlated	Bacilli	0.8	1.12E-12
		Actinobacteria	0.681	2.78E-08
		Coriobacteriia	0.664	8.25E-08
		Methanobacteria	0.658	1.14E-07
		Clostridia	0.656	1.31E-07
		Gammaproteobacteria	0.549	2.50E-05
	Negative-correlated	Bacteroidia	-0.636	4.08E-07
		Unassigned class of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Order (59)	Positive-correlated	Bacillales	0.777	1.26E-11
		Bifidobacteriales	0.708	4.47E-09
		Coriobacteriales	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriales	0.658	1.14E-07
		Clostridiales	0.651	1.78E-07
		Aeromonadales	0.571	9.74E-06
		Lactobacillales	0.52	7.67E-05
	Negative-correlated	Bacteroidales	-0.636	4.08E-07
		Unassigned order of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Family (99)	Positive-correlated	Peptostreptococcaceae	0.838	9.62E-15
		Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridiaceae	0.781	8.82E-12
		Bifidobacteriaceae	0.708	4.47E-09
		Paraprevotellaceae	0.67	5.66E-08
		Coriobacteriaceae	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriaceae	0.658	1.14E-07
		Lachnospiraceae	0.633	4.78E-07
		Succinivibrionaceae	0.571	9.74E-06
		Unassigned family of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcaceae	0.522	7.12E-05
	Negative-correlated	Ruminococcaceae	-0.729	8.81E-10
		Unassigned family of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned family of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Rikenellaceae	-0.649	1.92E-07
		Unassigned family of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
Unassigned family of Bacteria	-0.608	1.75E-06		

		Bacteroidaceae	-0.534	4.53E-05
		S24.7	-0.519	8.04E-05
Genus (168)	Positive-correlated	Unassigned genus of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		[Clostridium](putative)	0.828	3.48E-14
		Clostridium (Peptostreptococcaceae)	0.811	3.30E-13
		Clostridium (Clostridiaceae)	0.781	8.82E-12
		Ruminococcus	0.759	6.89E-11
		Enterococcus	0.706	5.05E-09
		CF231	0.698	8.95E-09
		Methanobrevibacter	0.611	1.52E-06
		Unassigned genus of Veillonellaceae	0.597	2.97E-06
		Succinivibrio	0.585	5.22E-06
		Methanosphaera	0.577	7.40E-06
		Unassigned genus of Lachnospiraceae	0.546	2.78E-05
		Unassigned genus of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcus	0.522	7.12E-05
		Unassigned genus of Bifidobacteriaceae	0.502	1.51E-04
	Negative-correlated	Unassigned genus of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.683	2.38E-08
		Unassigned genus of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Alistipes	-0.657	1.21E-07
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.618	1.08E-06
		Unassigned genus of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
		Unassigned genus of Bacteria	-0.608	1.75E-06
		Bacteroides	-0.566	1.23E-05
gut		-0.563	1.37E-05	
Oscillospira		-0.551	2.30E-05	
		Unassigned genus of S24.7	-0.519	8.04E-05
Species (206)	Positive-correlated	Unassigned species of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridium ruminantium	0.814	2.15E-13
		Unassigned species of Clostridium	0.804	7.20E-13
		Clostridium disporicum	0.797	1.62E-12
		Ruminococcus lactaris	0.755	1.03E-10
		Clostridium difficile	0.75	1.61E-10
		Unassigned species of Clostridium	0.719	1.89E-09
		Enterococcus casseliflavus	0.706	5.05E-09
		Unassigned species of CF231	0.698	8.95E-09
		Clostridium paraputrificum	0.634	4.60E-07
		Unassigned species of Methanobrevibacter	0.601	2.49E-06
		Unassigned species of Veillonellaceae	0.597	2.97E-06
		Unassigned species of Succinivibrio	0.585	5.22E-06
		Unassigned species of Methanosphaera	0.577	7.40E-06
		Unassigned species of Lachnospiraceae	0.546	2.78E-05
		Unassigned species of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcus equi	0.522	7.12E-05
		Unassigned species of Bifidobacteriaceae	0.502	1.51E-04
		Negative-correlated	Unassigned species of Bacteroidales	-0.696

	Unassigned species of Ruminococcaceae	-0.683	2.38E-08
	Unassigned species of Bacillales	-0.675	3.97E-08
	Unassigned species of Clostridium	-0.629	5.93E-07
	Unassigned species of Ruminococcaceae	-0.618	1.08E-06
	Unassigned species of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
	Unassigned species of Alistipes	-0.616	1.17E-06
	Unassigned species of Bacteria	-0.608	1.75E-06
	<i>Bacteroides nordii</i>	-0.568	1.11E-05
	gut metagenome	-0.563	1.37E-05
	<i>Oscillospira guilliermondii</i>	-0.551	2.30E-05
	<i>Alistipes finegoldii</i>	-0.531	5.11E-05
	Unassigned species of S24.7	-0.519	8.04E-05
	<i>Spirochaeta africana</i>	-0.505	1.36E-04

위에서 언급된 세 가지 결과 (그룹 간 미생물 상대적 풍부도의 통계적 분석, LDA 분석, 그리고 상관관계 분석)를 바탕으로 공통적으로 MAP 감염에 특이적 반응을 보이는 미생물을 수동으로 선별하는 과정을 거쳐 선별의 목적이 감염 지표 도출이었기에 선별에 사용한 기준은 각 분류군 수준에서 미지정된 (unassigned) 미생물은 제외하고, 감염군과 대조군에서 각각 한 번 이상 영 값 (zero value)이 나오는 경우는 제외하였다. 선별된 미생물들은 생물 분류군 수준별로 MAP 감염 시 그 분포가 증가하는 미생물과 감소하는 미생물을 짝지어 비율값으로 변환한 뒤, 그룹 간 통계적 유의차를 확인하였음. 결과적으로 문(Phylum, *Firmicutes* to *Bacteroidetes*), 강(Class, *Clostridia* to *Bacteroidia*), 목(Order, *Clostridiales* to *Bacteroidiales*, *Enterobacteriales* to *Clostridiales*), 과(Family, *Enterobacteriaceae* to *Ruminococcaceae*) 수준에서 총 5개의 예비 감염 지표를 선정할 수 있었다 (그림 10).

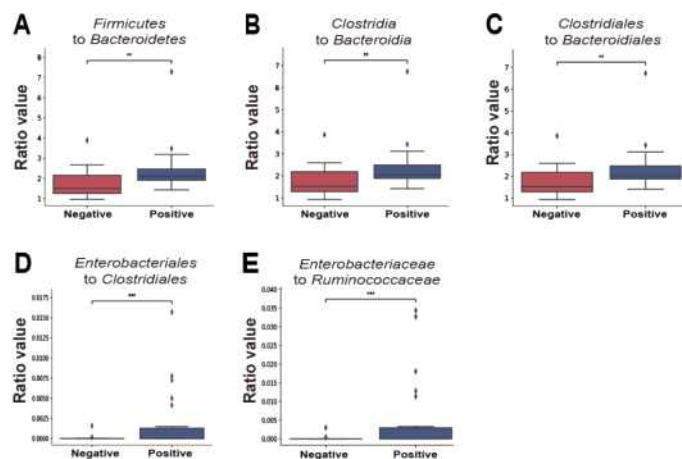


그림 10. 생물군 분류 수준별 잠재적인 MAP 감염 지표 5종
(A) 문 수준 (B) 강 수준 (C-D) 목 수준 (E) 과 수준

문 수준에서 종 수준까지의 미생물 분류군 588개를 나열한 다차원의 데이터 행렬을 생성한 후 분류 성능을 저해시킬 수 있는 값이 거의 일정한 (quasi-/constant value) feature를 제거하였고, 이를 통해 110개의 feature가 제거되었고 이후 과정에서는 478개의 feature만을 이용하여 분류모델을 만드는데 사용하였다. 제거 전 (Before)과 후(After)의 데이터 행렬을 2차원으로 차원 축소를 하여 지도 학습의 일종인 LDA, 비지도 학습의 일종인 PCA (principal component analysis)를 이용하여 데이터의 보존 정도를 확인해본 결과 매우 유사하게 시각화가 되는 것을 확인하였다 (그림 11). 또한 정량화

수치인 silhouette score (Before: 0.611358, After: 0.640311)과 calinski score (Before: 128.823863, After: 129.55748)가 거의 유사한 것을 통해서 제거 전후의 데이터 특성이 거의 동일함을 확인하여 이후 feature 선별에는 478개의 feature들만을 사용하였다.

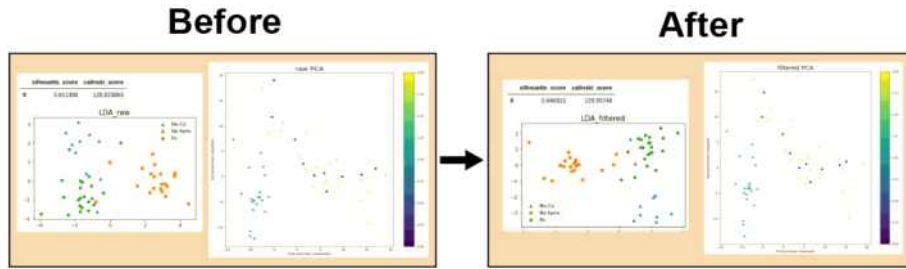


그림 11. 상수 값 제거 전(Before)과 후(After)의 LDA와 PCA plot 및 정량화 수치 (silhouette score, calinski score)

이후 분류 문제 (classification)에 대한 모델 생성시 과적합(overfitting)을 방지하고자 자주 사용하는 정규화 (regularization) 회귀 방식인 Ridge, LASSO, ElasticNet 회귀방식과 함께 최근 널리 사용되고 있는 Feature Selector, Filter Method 방식까지 총 5가지 방법을 통해서 주요 feature를 선별하고 기존 데이터를 얼마나 보존하고 있는지를 확인하였다. 이 때 기존 미생물 상대적 풍부도 값 자체를 사용하는 것 (이하 Raw data) 외에도 분류 성능 증진을 목적으로 데이터 간 분산을 증가시키고자 기존 값에 1.5 거듭제곱을 해주는 거듭곱 변환 (1.5 power transformation, 이하 1.5 power)과 자연 상수 e를 밑으로 하고 기존 값을 지수로 한 거듭곱 변환 (exponential transformation, 이하 exp)을 한 값을 이용해서 분석을 진행하였다.

세 가지 데이터에서 공통적으로 Feature Selector가 가장 적은 feature 개수를 선별하였고, 전체 데이터 대비 95% 가량을 표현할 수 있었다 (cumulative importance = 0.95). 따라서, MAP에 민감하게 반응하는 미생물 집단을 선별해내어 감염 분류 모델을 만드는데는 Feature Selector를 통해서 진행하기로 결정하였다. 이어서 파라미터 최적화 과정(missing threshold=0.6, correlation threshold=0.98, task=classification, eval_metric=auc, cumulative importance=0.95)을 통해 최종 모델 설계 및 그 성능을 평가하는 과정을 진행하였다. 각각의 데이터 종류 별로 뽑힌 feature의 갯수는 Raw data 조건 10개, exp 조건 13개, 그리고 1.5 power 조건 14개였으며, 뽑힌 feature들의 종류와 그 중요도를 확인해보았다 (그림 12). 모든 경우에서 가장 중요한 feature로 선별된 미생물은 앞선 LDA분석시 MAP감염군 특이적으로 분포가 증가한 것으로 확인되었던 *Clostridium difficile* 이었으며, 그 외에 앞서서 예비 감염 지표 선정에 활용되었던 *Bacilli* 등도 일관되게 선별되었다.

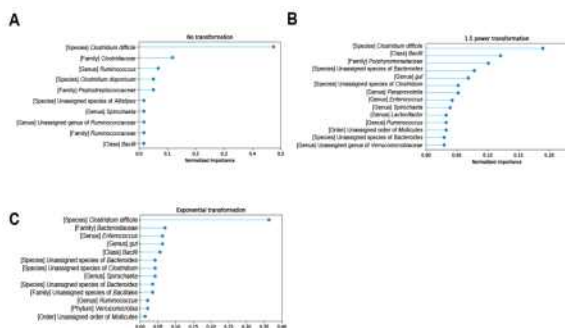


그림 12. 데이터 종류별 선별된 feature들의 중요도 평가 (A) Raw data (B) 1.5 power (C) exp

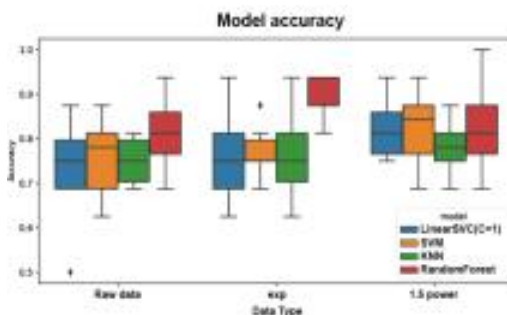


그림 13. 4가지 학습 알고리즘에 따른 각 데이터 종류별 모델 정확도 평가

MAP 감염 분류 모델은 선별된 feature들에 대한 현재의 52개 샘플 데이터를 이전 과정과 동일하게 raw data, 1.5 power, exp 형태로 준비하고, 각각의 사례별로 train set과 test set 7:3의 비율로

나누어서 전자는 모델 학습에 이용하고 후자는 성능 평가에 활용하는 방식으로 제작하였다. 일반적인 기계학습에 비해 상대적으로 적은 샘플의 개수인 상황을 고려하면서 편향된 검증 (biased validation)을 방지하기 위해서 무작위로 train과 test set을 선별하는 과정을 10회 독립 시행한 뒤 그 accuracy 등을 파악하여 모델의 성능을 평가하였음. 모델의 학습 알고리즘은 support vector machine (linearSVC, SVM), k-nearest neighborhood (KNN), random forest를 활용하였다. 그 결과, 전반적으로 random forest 알고리즘을 이용하였을 때 정확도의 평균값이 0.8 ~ 0.9로 준수한 성능을 보여주었으며 특히 exp 데이터를 활용한 경우 정확도의 평균값 (0.8875)이 최고치를 기록하였다 (그림 13).

추가적으로 진단 결과를 포함하였을 때, 모델의 분류 성능이 증가하는지를 보기 위해서, ELISA s/p ratio값과 fecal PCR 기반 MAP cfu count 값을 각각 추가하거나 혹은 함께 (both) 모델에 학습시켰을 때 예측 정확도를 확인하였다. 그 결과 전반적으로 진단검사 지표가 추가되었을 경우 ELISA 결과(그림 14A), PCR 결과 (그림 14B)가 활용된 사례 모두 기존 모델 대비 분류의 성능이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 가장 높게 나온 조건은 2가지 진단 검사 결과를 모두 포함 (그림 14C)하고 미생물 상대적 풍부도 데이터 종류는 exp 데이터를 활용하여 random forest 알고리즘을 활용한 경우 (0.9125)였음. 이를 종합적으로 고려해보았을 때, Feature Selector를 이용해 선별된 십 수 개의 미생물들의 상대적 풍부도값을 자연상수를 밑으로 하는 지수변환 값만으로도 정확도 기준 0.8~0.9 수준의 높은 예측 모델을 만들 수 있다는 것을 확인하였고, 여기에 진단 검사 결과를 함께 반영한다면 더욱 그 성능을 높힐 수 있어서 보다 정확한 진단이 가능해질 수 있다고 판단된다.

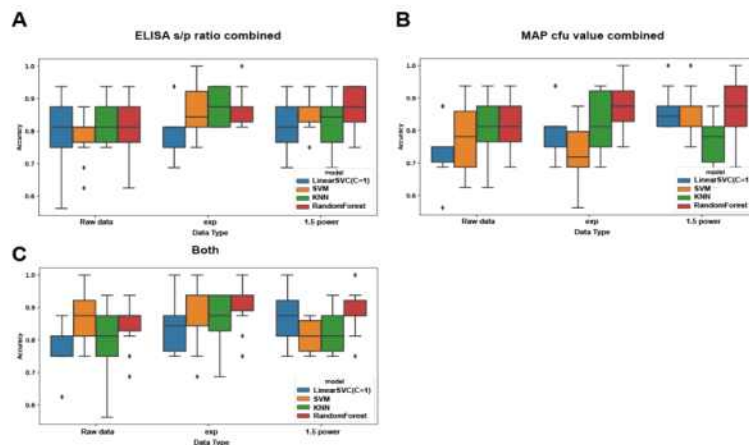


그림 14. ELISA, PCR 진단검사 결과를 학습 데이터로 추가하였을 때 모델 정확도 평가

(A) ELISA 결과 추가 조건 (B) PCR 결과 추가 조건 (C) 모두 추가 조건

요약하면, MAP 감염을 식별할 수 있는 미생물학적 바이오마커를 발굴하기 위해 총 52개의 분변샘플을 양성농장 감염우, 양성농장 내 미감염 동거우, 음성농장 미감염우로부터 샘플링하여 각각의 장내균총 분포를 확인하였고, 감염 유무 등으로 그룹을 나누어 미생물 군집 다양성 분석 등을 통한 거시적 변화와 통계적으로 유의미한 상대적 풍부도값 변화 미생물들을 확인하였다. 그 결과, MAP 감염군의 장내균총 내 풍부도, 균등도, 다양성 등이 전반적으로 감소함으로써 미감염우에 비해 확연한 장내균총의 변화와 그에 따른 장 내 균총유래의 집단유전체 활성 대사도 바뀔 수 있음을 확인함. 또한, 통계적 유의미성을 기준으로 미생물들을 일부 선정하였고 다양한 생물 분류군 수준에서 MAP 감염의 지표로 활용할만한 비율값 5종을 제안하였음. 이외에도 보다 정확한 바이오마커를 발굴하기 위해서 실험자의 주관이 들어가지 않고 고차원의 데이터 내에서 주요한 feature를 선별해주는 다수의 알고리즘을 장내균총 데이터에 활용하여 결과적으로 *Clostridium difficile*, *Bacilli* 등의 십 수 개의 미생물 분류군을 선별해낼 수 있었다. 또한 이들 미생물들의 상대적 풍부도 값과 함께 ELISA, PCR 검사 결과를 함께 활용함으로써 보다 우수한 성능의 분류모델을 만들 수 있음도 확인였고, 이번 연구에서 선별된 주요 미생물들의 상대적 풍부도값을 확인한다면, 기존 진단 방법들과 병용함으로써 보다 신속하고 정확한 진단이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 내용들은 MAP감염 예측 모델에 대한 ROC curve

작성 및 AUC 를 계산하였고 (그림 15) 이에 대한 각 예측모델별 performance metrics를 분류하였다 (표 13).

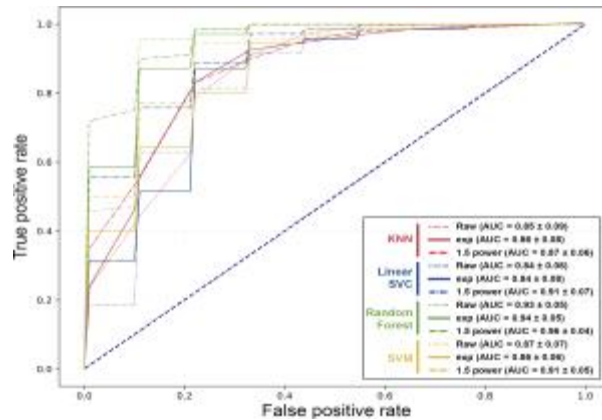


그림 15. ROC curves and AUC for MAP infection-predictive models.

표 13. MAP감염 예측 mode 에 대한 performance metrics 분류

Algorithm	Data set	Precision	Recall	F1 score	AUC
KNN ($k=3$)	Raw	0.81±0.11	0.79±0.11	0.79±0.11	0.86±0.09
	1.5 power	0.80±0.06	0.78±0.05	0.77±0.06	0.87±0.06
	Exp	0.83±0.11	0.82±0.11	0.82±0.11	0.86±0.08
LinearSVC	Raw	0.76±0.11	0.75±0.10	0.75±0.10	0.84±0.06
	1.5 power	0.86±0.09	0.84±0.09	0.84±0.09	0.91±0.07
	Exp	0.78±0.06	0.76±0.07	0.75±0.07	0.84±0.08
Random forest	Raw	0.90±0.07	0.89±0.08	0.89±0.08	0.93±0.05
	1.5 power	0.88±0.05	0.84±0.08	0.84±0.08	0.96±0.04
	Exp	0.88±0.07	0.86±0.07	0.85±0.08	0.94±0.05
SVM	Raw	0.80±0.09	0.77±0.08	0.77±0.08	0.87±0.07
	1.5 power	0.82±0.07	0.80±0.08	0.79±0.09	0.91±0.05
	Exp	0.80±0.04	0.79±0.04	0.79±0.05	0.86±0.06

3. MAP 돌연변이 주 (mutant) 제작 및 특성 분석을 통한 신규 병원성 인자 규명

본 연구실의 선행연구결과 및 타 연구자들의 선행연구결과를 바탕으로 MAP 병원성과 밀접한 관련성을 가질 것으로 예측되는 13개의 유전자를 선정하여 분류하였으며, 선정된 유전자들중 4개 유전자들 (표 14) 선택하여 발현억제 돌연변이 작성을 위한 primer를 제작하였고,

표 14. CRISPRi mutant 제작을 위한 MAP의 병원성 관련 유전자 선정

Gene name	Function	Feature
Mdh (Malate Dehydrogenase)	Catalyzes the interconversion between malate and oxaloacetate	Expressed under stress conditions and activating dendritic cells
Hypothetical protein (Putative Nucleic Acid-Binding Protein)	DNA-binding protein	Th1 response induction and dendritic cell activation
PknG (Protein Kinase G)	Inhibition of phagosome-lysosome fusion	Induce IFN- γ production in sub-clinical infected individuals
Icl (Isocitrate Lyase)	Catalyze the conversion between	Important for intracellular survival in

이들 유전자에 대하여 primer와 plasmid 를 이용하여 construct 를 제작하였고, 이를 *E. coli* 에 cloning 한후, 재정제하여 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 competent cell 에 electrophoration 한후 37°C에서 4~6주 배양하여 돌연변이체를 작성하였다. 이들 돌연변이체는 PCR 검사를 통하여 확인하였다 (그림 16)

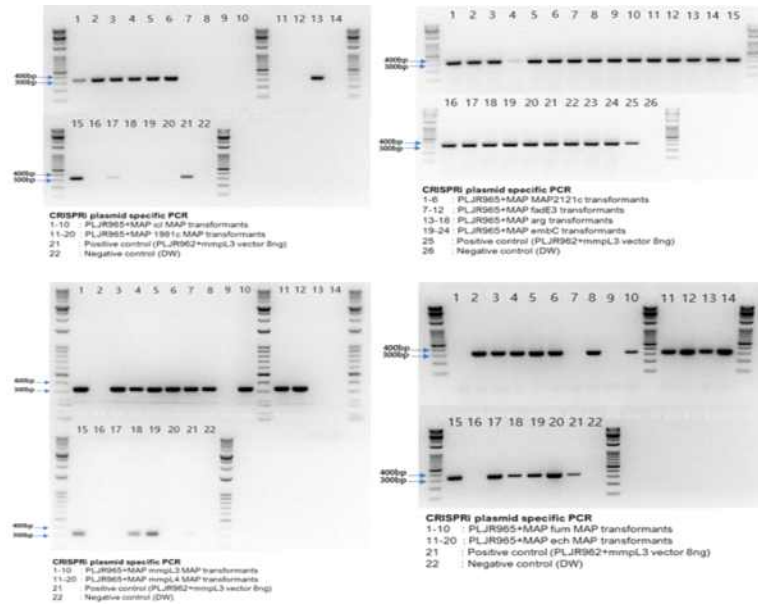


그림 16. 제작된 MAP mutant에서 CRISPRi plasmid의 확인

제작된 13종의 MAP mutant를 OD₆₀₀=0.5 정도까지 배양한 후 CRISPRi의 유도물질인 anhydrotetracycline (ATC)이 첨가된 7H10 agar와 첨가되지 않은 7H10 agar에 각각 일정 희석배수로 희석하여 접종 후 배양한후, 4주 동안 배양한 뒤 해당 유전자의 발현 억제에 미치는 영향을 분석하였다. 또한 돌연변이주의 유전자 발현 억제 정도를 ATC를 첨가하여 유도한 후 real-time PCR을 통해 확인하였다.

Transcription repression을 직접적으로 확인하기 위해 CRISPRi induction 후 7일차에 ATc를 세 가지 농도로 (low: 10µg/ml, mid: 30µg/ml, high: 100µg/ml)로 target gene의 유전자발현수준을 qRT-PCR을 통해 측정하였다. 선정한 4개의 유전자 모두에서 30µg/ml의 ATc를 투여했을 때, 제일 좋은 유전자 발현 억제 효과를 나타내었다 (그림 17 upper panel). 이후 30µg/ml의 ATc를 투여했을 때 1일 차, 3일 차 및 7일 차에 유전자 발현이 유의적으로 억제됨을 확인하였다 (그림 17 lower panel).

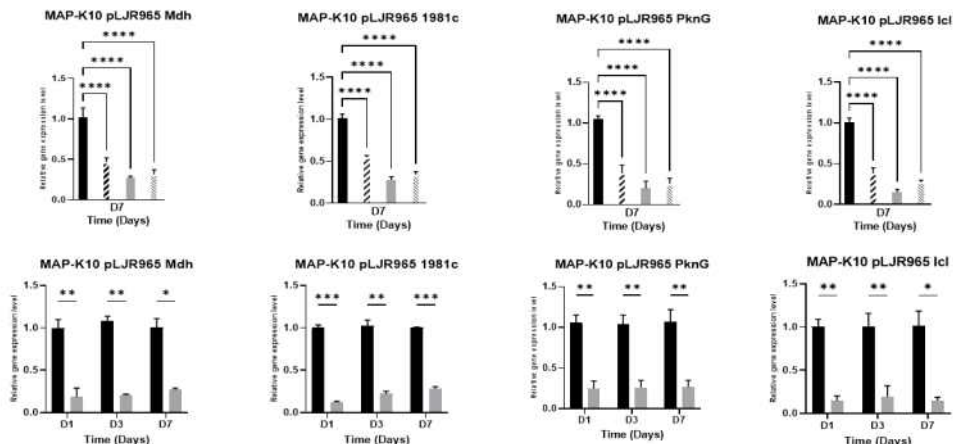


그림 17. MAP mutant에서 ATc 투여에 따른 유전자 발현 억제 비교

4. 소 류코시스의 cell-counter를 활용한 감염우 진단법 평가

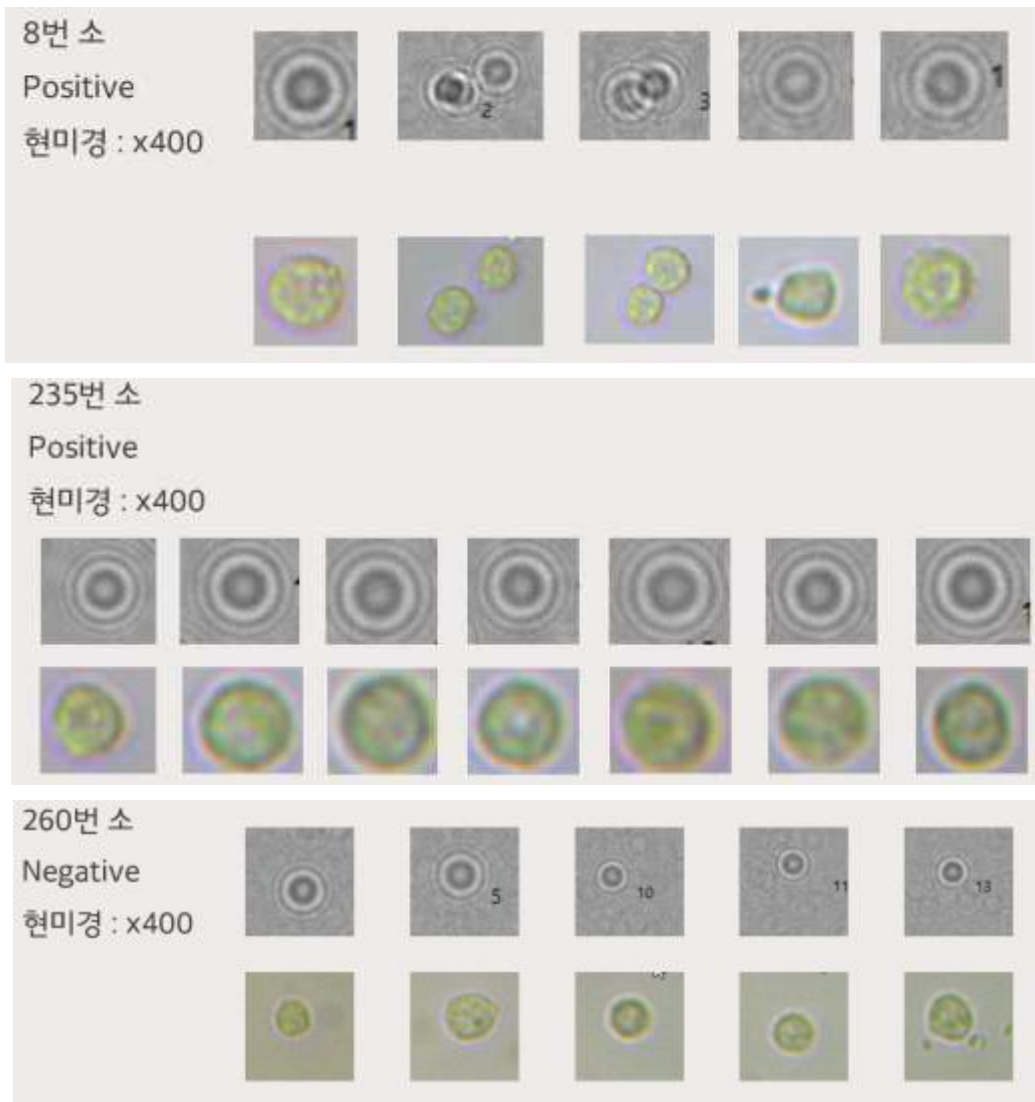
- Lens-free shadow imaging technology

세포에 특정 파장의 가간섭성 빛을 조사하고 발생한 세포의 그림자 이미지(Digital in-line hologram)를 렌즈가 제거된 이미지센서를 이용하여 촬영하고 전용 알고리즘으로 자동분석하여 세포의 계수, 활성도 측정, 표면 및 내부 분석에 응용하는 신개념 세포이미징 기술




세포의 개수, 크기, 형태, 표면, 굴절률, 과립도 등의 정보
-> 그림자 이미지(hologram)의 차이로 나타남

- BLV Positive 소의 혈액에서 PBMC를 분리하여 이미지 촬영을 실시하였다.



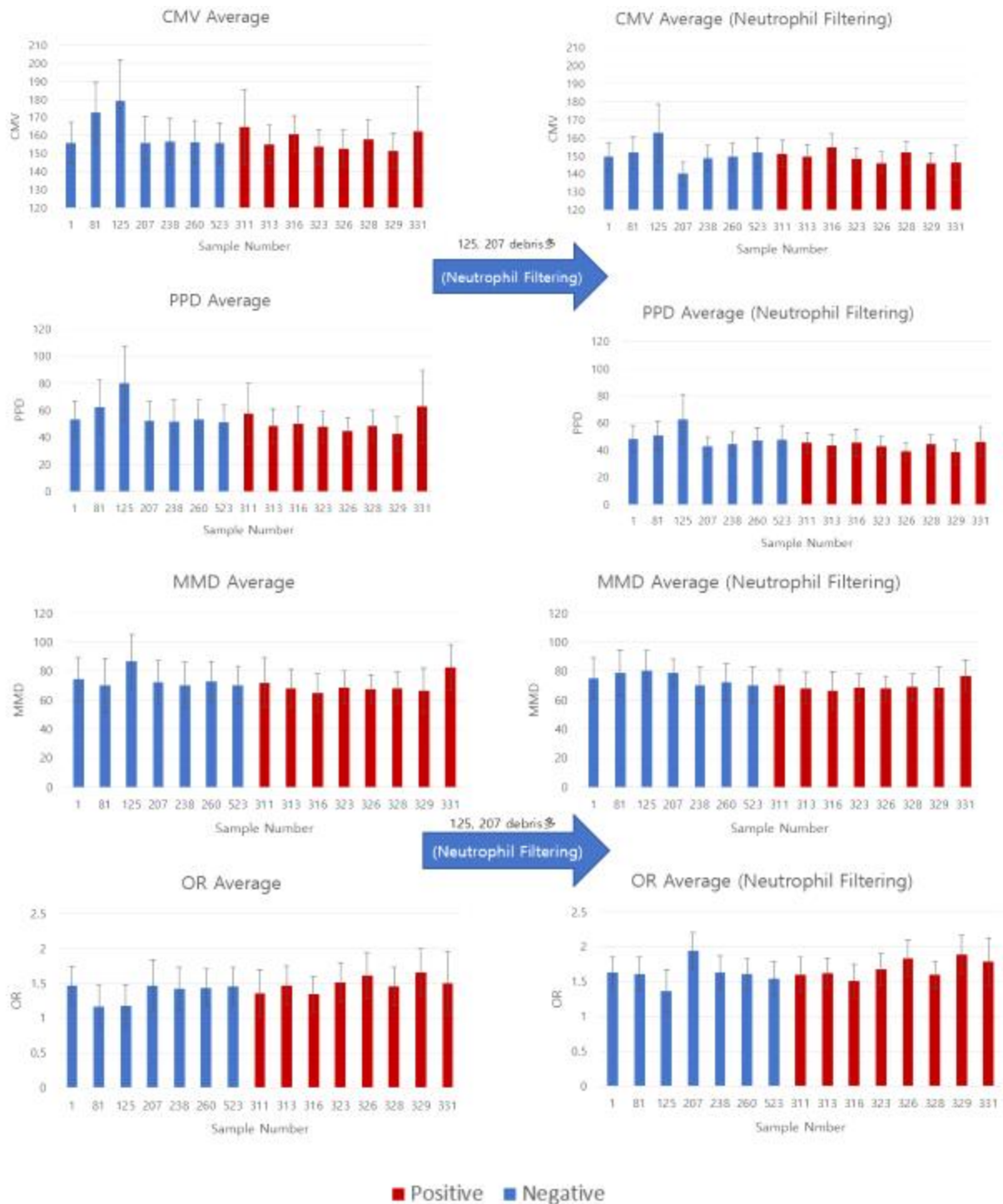
- shadow parameter 비교 분석 결과, BLV positive소에서 CMV가 낮은 경향을 보였다.

Shadow parameter

Positive : 8번 434 cell, 235번 592 cell
Negative : 125번 348 cell, 260번 484cell

Parameter average	8번 양성	235번 양성	125번 음성	260번 음성
CMV	155.8	153.4	164.9	168.3
MMD	67.2	66.8	62.3	68.8
PPD	47.1	44.1	52.4	60.2
SNR[dB]	29.5	32.9	28.4	26.9

- BLV 양성우 8두와 음성우 7두에서 PBMC를 분리하여 재검증하였고, PBMC의 대부분을 차지하는 neutrophil을 CBC 결과를 기준으로 filtering을 실시하였다.



- Filtering 결과, LSIT 기술을 이용하여 세포들의 형태적 차이를 확인하기에는 어려움이 있었다.

5. 목장 단위에서 소 류코시스 질병관리법 평가

- 경제성 저하를 호소하는 3개 목장을 선정하여 혈액 검사를 실시하였다.
- 각 젖소목장의 주 호소는 상이하였다. 세 농가 모두 개체들에 대한 신체검사 결과, 유의미한 이상은 없었으나, 혈액검사 결과 일부 개체에서 lymphocytosis가 확인되어 nested-PCR에 의한 소 류코시스 진단을 실시하였다.

번호	목장 위치	주 호소	채혈 두수	PCR 진단 결과 양성 두수	양성율(%)
1	충청남도	알콜불안정유	25	20	83.3
2	경기도	분만회복 지연	10	9	90.0
3	경기도	준임상형 유방염	16	13	81.3
계			51	42	82.4

- 일부 젖소농장에 대한 결과라는 제한점이 있으나, 예상했던 것보다 높은 양성율을 보였으며, 소 류코시스의 경우 여러 경로를 통해 동거축에게 전파될 가능성이 있다. 또한 증상이 발병하기 전까지는 농가에서 감염 개체를 선별하는데에 어려움이 있다. 따라서 국내 농가에 대한 전반적인 소 류코시스 감염 모니터링이 필요하며, 전파 방지 및 근절을 위한 소 류코시스 관리법에 대한 방안 강구가 요구된다.

※ 4차년도 연구개발 목표 및 결과

1. 국내 요네병 감염실태 조사 및 역학적 특성 조사

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사

4년차에는 국내 사육 소 농장으로부터 수집한 35개의 분변 및 32점의 혈청에 대하여 진단검사를 실시하였다. 수집한 분변 및 혈청가검물은 1, 2 및 3년차와 동일한 방법으로 검사를 수행하였다. 즉, real-time PCR을 이용한 분변내에 IS900 및 ISMap02 유전자 검출, ELISA kit (IDEXX Lab, USA)를 이용한 MAP 특이 항체 검출 및 양성개체의 분변으로부터 MAP의 분리, 동정을 실시하였다. 요네병 양성 분변 샘플의 경우 Versa-TREK을 이용하여 샘플 내 요네병균 배양 여부 확인 후 7H10 agar plate에 도말하여 균 colony를 형성한 경우 이를 집락으로부터 MAP IS900 유전자 primer를 사용하여 PCR 검사를 통해 MAP 균임을 확인한후 다음 사용시 까지 -70°C에 보관하였다.

○ 국내 사육 소의 요네병 진단검사 결과

총 32두의 소에서 채취한 35개 분변 샘플, 32점의 혈청 샘플에서 진단검사를 진행하여 각각 분변 샘플에서 6두 (17.1%), 혈청 샘플 1두 (3.1%)에서 요네병 양성을 나타내었다 (표 15).

표 15. 소 요네병 진단 총 검사 두수 및 양성/음성 개체 두수

	검사 두수 (n=35)	
	분변 (n=35)	혈청 (n=32)
양성	6	1
음성	29	31

각 개체별 분변 PCR 검사결과와 ELISA 검사결과 S/P ratio는 아래의 표 16과 같다.

표 16. Real-time PCR 및 ELISA를 사용한 소 요네병 진단검사 개체 목록

번호	개체번호	판 정	
		Real-time PCR (분변)	ELISA S/P ratio (혈청)
1	160XX	양성	양성 (74.5)
2	220XX	-	42.3
3	J18XX	양성	9.2
4	160XX	양성	9.3
5	170XX	-	9.1
6	220XX	-	4.2
7	220XX	-	3.1
8	J18XX	-	4.4
9	J18XX	-	6.5
10	PXX	양성	-
11	PXX	양성	-
12	PXX	양성	-
13	88XX	-	0.8
14	89XX	-	1.5
15	66XX	-	1.8
16	32XX	-	2.8
17	85XX	-	1.2
18	81XX	-	2.8
19	29XX	-	4.0
20	75XX	-	3.9
21	26XX	-	6.2
22	30XX	-	1.0
23	30XX	-	2.3
24	31XX	-	1.6
25	28XX	-	2.4
26	73XX	-	10.0
27	28XX	-	2.1
28	95XX	-	2.6
29	30XX	-	1.7
30	30XX	-	3.7
31	84XX	-	1.8
32	56XX	-	5.1
33	75XX	-	4.1
34	61XX	-	6.4
35	54XX	-	8.1

2. MAP 돌연변이 주 제작 및 특성 분석을 통한 신규 병원성 인자 규명 - 3년차 계속

MAP 돌연변이주의 target gene 이 MAP 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 ATc 로 target 유전자 발현을 조절하면서 성장곡선 (growth curve) 을 작성하였다. 4개의 유전자중 mdh 유전자의 발현을 억제했을 때 MAP 성장이 억제됨을 확인할 수 있었다 (그림 18).

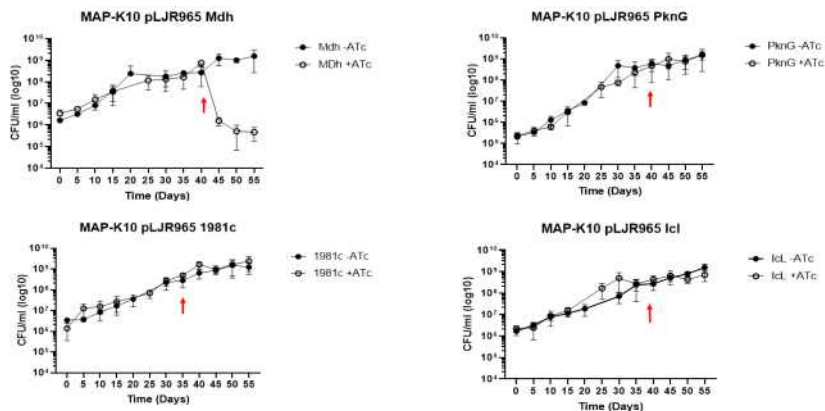


그림 18. MAP mutant에서 ATC 투여에 따른 성장 형태 비교

MAP의 target gene에 대한 CRISPRi gene silencing이 성장 및 표현형에 미치는 영향을 분석하기 위하여 CRISPRi knockdown MAP mutants를 30µg/ml ATc의 첨가 여부에 따라 3가지의 성장 약 조건 (stressful conditions) 즉, 영양고갈(nutrient starvation), 산화능(oxidative stress), 및 산성 조건 (acidic stress) 속에서 14일간 성장능 (bacterial viability)을 비교 분석하였다. 이때 Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress, 1981c mutant는 oxidative stress 및 acidic stress에서 생존능 (survival) 이 감소함을 확인 하였다 (그림 19).

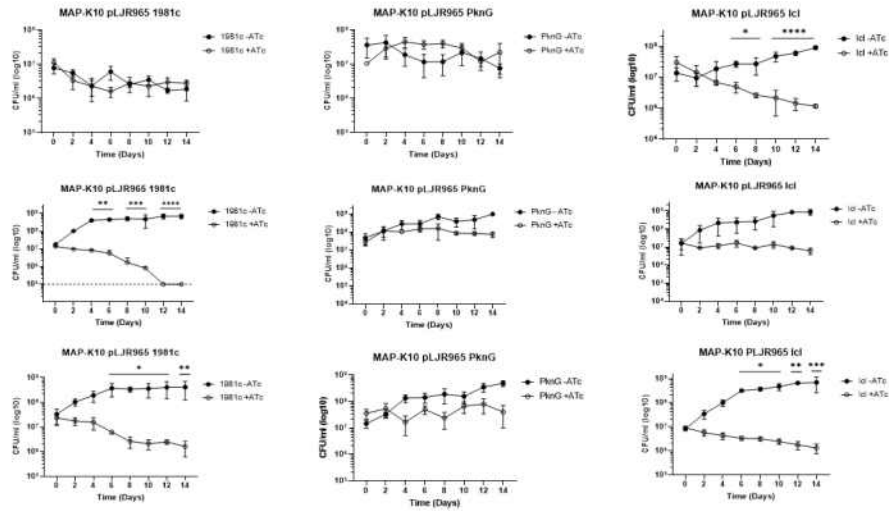


그림 19. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 생존률

CRISPRi를 통한 target 유전자 (PknG, MAP1981c 및 Icl)의 발현 억제가 stress 조건하에서 MAP 집락의 형태 (colony morphology) 및 응집능 (aggregation) 을 관찰하였다. 관찰 결과, PknG mutant는 nutrient starvation, 1981c mutant는 oxidative stress, Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress에서 집락의 형태 및 응집능에서 변화가 발생함을 확인하였다 (그림 20 및 21).

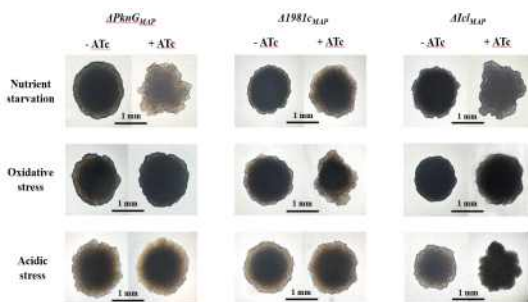


그림 20. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 집락 형태 변화

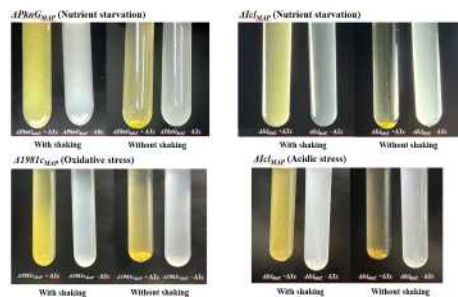


그림 21. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 균체응집 변화

CRISPRi system 을 이용한 MAP mutants 가 특정유전자 발현의 억제 및 stress 조건하에서 envelope 표면의 변화를 Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) 을 이용하여 관찰한 결과 특정유전자 발현의 억제와 각 stress 조건에서 세포의 크기의 감소 (shortness), 표면의 위축 (shrinkage) 에 차이가 나타났다. 즉, MAP의 PknG mutant 는 nutrient starvation 조건에서, MAP1981c mutant 는 oxidative stress 조건에서, Icl mutant는 nutrient starvation 및 acidic stress 조건에서 발현억제에 따른 세포크기의 감소 및 표면의 위축에서 차이를 나타내었다 (그림 22).

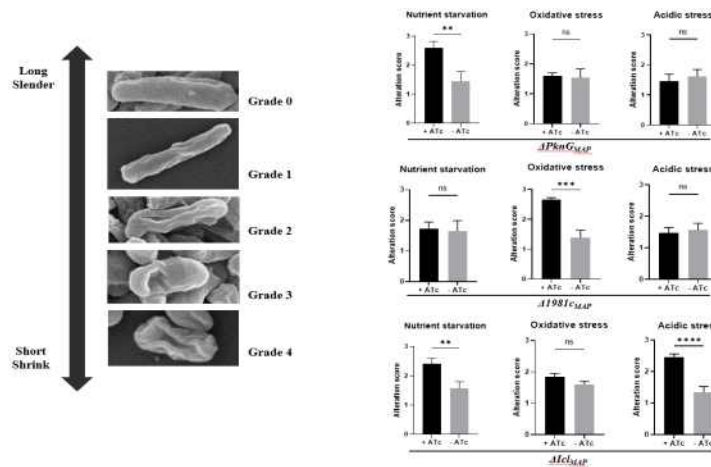


그림 22. MAP mutant에서 ATc 투여 및 stress 조건에 따른 균체변화

결론적으로 Mycobacteria의 pathogenesis와 관련된 유전자를 선정하고, 선정된 유전자들을 대상으로 CRISPRi system을 사용하여 제작된 MAP mutant를 통해 각 유전자 발현 억제 및 여러 stress 조건 따른 pathophysiological characteristics를 비교 및 관찰하였다. 선정된 유전자의 발현 억제를 수행했을 때 발생할 수 있는 성장특성 및 다른 stress 조건하에서 survival rate의 비교는 MAP의 성장에 필수적인 유전자 확인 및 intracellular survival과 연관된 유전자에 대한 정보를 제공하였다. 그리고 선정된 유전자의 발현 억제 유무 및 다른 stress 조건에 따른 colony morphology and aggregation 관찰을 수행하였다. 또한 mycobacterial envelope alteration을 단계별로 나누고 scoring을 통해 어떤 조건에서 어떤 gene의 유전자 발현을 억제했을 때 surface가 변화하는지 관찰하였다. 변화에 따른 유전자가 외부 침입자에 대한 숙주의 defense process에 대항하여 살아남는 survival mechanism과 관련된 다양한 physiological process와 연관성이 존재하는 유전자라고 생각한다. 이러한 결과는 CRISPRi를 사용한 MAP mutant 제작을 통해 mutants의 성장, 여러 stress 조건하에서 생존 및 집락형태 (colony morphology) 의 특성이 MAP 감염이나, 발병과 매우 밀접한 관련성이 있다는 것을 시사하고 있다.

3. 요네병의 조기진단에 의한 우균 청정화 방법 개발

요네병 (Johne's Disease 또는 Paratuberculosis)은 요네병균 (MAP) 감염에 의한 반추류의 만성, 소모성 질병으로, MAP 감염되면 긴 잠복기 후 산유량감소, 만성의 설사로 쇠약, 급격한 체중감소 등의 임상증상 발현 후 폐사하는 전염병이다. 이 질병은 우리나라 뿐만 아니라 미국, 유럽 등 여러 나라에서 발병하고 있으며 생후 4개월 이내의 어린 송아지 시절에 주로 감염되어 긴 잠복기 (2~3년)를 거쳐 초기에 특별한 임상증상의 발현 없이 분변을 통해 다량의 균을 배출하여 주변 환경을 오염시켜 주요 오염원으로 작용한다. 분변으로 배출된 요네병균은 목장 내의 물, 사료, 우유 및 주위 환경을 오염시켜 목장 내에 지속적으로 감염이 발생된다. 이때문에 한번 질병이 발생된 목장에서는 이질병의 근절이 매우 어렵다. 특히 요네병균은 외부환경에서 높은 저항성을 가지고 있어서 오랫동안 생존할 수 있는 특성을 가지고 있어 한번 환경이 오염되면 지속적인 발병을 유발한다.

요네균의 감염은 크게 4단계로 나누어 볼 수 있는데, 1단계는 “잠복감염” 상태로 이 시기의 동물은 임상 증상을 전혀 보이지 않으며, 분변을 통해 균을 배출하지도 않는다. 2단계는 “준임상형”상태로 1단계와 마찬가지로 임상 증상을 전혀 보이지 않지만 분변을 통해 균을 환경으로 배출하여 질병의 전파에 중요한 매개체로 작용한다. 특히 이 단계에서 대부분의 개체들은 혈청학적으로도 양성을 나타내지 않는다. 3단계와 4단계는 “임상형”, “진행된 임상형” 상태로 분변을 통한 다량의 균배출과 함께 만성적인 설사, 쇠약을 비롯한 전형적인 임상증상을 보이면서 폐사에 이르게 된다. 이러한 임상증상의 발현으로 요네병은 젖소와 육우에 있어서 산유량 감소, 성장을 저하 및 감염동물의 도태 등에 의한 많은 경제적인 손실을 유발하고 있다.

○ 외국 요네병 방역 사례

일본의 경우 요네병 박멸을 위해 국가에서 체계적인 관리를 하고 있다. 1998년 이후 5년 주기로 검사를 모든 목장을 대상으로 요네병 검사를 시행하고 있다. 정기적인 검사를 통해 목장의 등급을 정하여 관리하고 있다. 한번이라도 감염된 목장은 국가에서 지속적인 관리를 하며, 위생상태를 검사받게 한다. 또한 목장주를 대상으로 위생관리교육을 실시하며, 진료수의사의 협조를 받아 지속적인 목장의 위생상태를 관리한다. 또한 분변검사를 통해 분변으로 균을 배출하는 개체들은 도태를 권고하고 있다. 감염동물의 조기검출을 위한 지속적인 연구를 수행하고 있다. 이처럼 목장의 정기검사, 목장의 등급 설정, 감염목장의 지속적인 모니터링등을 통해 질병을 감소시키고자 한다. 무엇보다도 감염된 개체와 접촉하였던 개체들의 지속적인 검사 및 도태 권고 또한 목장 내에서의 2차적인 전파를 예방한다.

호주의 경우 1911년 수입소의 검역과정에 요네병을 처음 확인한 이후 급격한 발생을 보였으나, 국가 단위의 목장인증프로그램 (Australian Johne's Disease Market Assurance Program for Cattle)을 1996년부터 시행하고 있어서 이후 몇 번의 시행착오를 거쳐 젖소목장의 요네병 감염상황에 따른 평가시스템 (National Dairy BJD Score)을 개발하였고, 이 system을 이용하여 각 목장의 등급을 분류하였다. 이 시스템의 적용으로 비교적 성공적으로 요네병을 통제하고 있다고 평가하고 있다. 요네병의 전파를 방지하는 가장 중요한 부분은 실제로 목장 내에서 시행되고 있는 방역조치라고 생각된다. 즉 송아지와 감염된 개체의 접촉을 원천적으로 차단시키는 것이 요네병의 전파를 방지하는 중요한 방법으로 제시되고 있다.

미국에서 전국적인 수준의 요네병 검사는 1996년 National Animal Health Monitoring System (NAHMS) 에 의해서 처음 실시한 결과 목장에 따라서 매우 높은 비율로 감염되어 있는 것을 확인하였다. 미국에서 요네병정정화를 위한 자발적인 프로그램을 개발하여 요네병 목장인증프로그램을 시행하고 있으며, 현재 미국 농무부 및 APHIS 의 주도하에 실시하고 있다. 이는 크게 생산자 교육, 목장의 위해도 평가 및 관리, 목장의 등급분류를 중요한 관리요소를 하여 시행하고 있다. 일부주에서는 주자체에서 요네병박멸프로그램을 추가적으로 시행하고 있다. 이러한 위생프로그램의 개발 및 시행으로 위생적인 우유 등 축산식품을 생산하고자 하는 노력을 하고 있다.

스웨덴은 1952년 소 요네병을 법정전염병으로 규정하여 관리하고 있다. 2009년에서 2014년 까지 소의 분변 PCR 검사 및 배양검사에서 요네병균 (MAP)이 검출되지 않았다. 이는 요네병 방역프로그램인 Swedish Animal Health Service을 운영하면서 매년 모든 목장의 2개월된 소에 대하여 분변 PCR 검사 및 배양검사를 실시하고 있으며, 음성의 횟수에 따라 목장의 등급을 결정하고 있다. 이에 젖소의 경우 발생한 경우가 전혀 없으며, 육우의 경우도 2005년에 마지막으로 발병하였다. 감염된 개체가 나온 목장의 모든 개체들을 도태시키며, 이후에도 지속적으로 모니터링 하여 재발 여부를 확인하는 정책이 요네병 근절에 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

네덜란드의 경우 약 54% 의 목장이 요네병양성을 나타내었으나, 2006년부터 요네병 청정화프로그램을 새롭게 개발하여 적용하고 있다. 우유를 통한 ELISA 검사결과를 바탕으로 목장의 등급을 결정하고 이에 따라 관리하며, 목장의 등급에 따라 우유판매의 제한과 같은 불이익을 받게 한다. 이러한 노력을 통해 비교적 감염된 목장이 많은 실정이었지만 체계적인 농장 분류 시스템의 개발 및 적용, 경제적인 불이익을 통해 양성개체의 도태 유도, 착유우를 대상으로한 검진실시등이 요네병의 전파의 감소에 효과적이었다고 생각한다.

○ 한국형 요네 조기진단에 의한 우군 청정화 프로그램 제안

위에서 언급한 요네병의 특징 및 해외 사례에서 알 수 있듯이, 목장 내부에서 질병의 전파 방지를 위한 사육 환경의 전반적인 개선뿐만 아니라 요네병의 조기진단을 통한 감염 개체 확인 및 분리를 통해 감염 가능성을 원천 차단하는 것이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 따라서 국내 역시 해외의 사례들과 마찬가지로 사육 환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 조기진단법 확보가 필수적이라고 할 수 있다.

해외의 사례들을 통해 각국의 요네병 예방 및 관리 프로그램에 차이가 있기도 하지만, 이에 대한 공통점을 가지고 있다. 이를 바탕으로 한국형 우군 청정화 프로그램을 제안한다.

- ① 정기적인 요네병 검진을 수행하고 있었으며,
- ② 송아지가 태어난 후 즉시 성숙과 분리 사육하여 송아지의 감염 가능성을 차단하였다. 또한 ③ 수직 감염의 위험성에 따라 요네병 음성으로 확인된 개체로부터 얻은 안전한 초유를 공급하여 송아지로의 수직 감염의 위험성을 차단하였다.
- ④ 목장 내의 환경을 청결하게 유지하는 것도 중요 정책 중 하나로 특히 분만사나 송아지를 기르는 공간은 청결하게 유지되도록 하였고, 최적의 위생적인 관리를 하도록 하였다.

요네병 양성개체의 경우 정기적인 검사를 통해 양성개체는 즉각 격리하며 이후 설사 등의 임상증상이 나타나게 되면 도태하여야 한다. 또한 임상증상을 보이지 않고, 혈청학적 음성이나, 분변으로 요네병 균을 배출하는 준임상형의 검색을 위한 진단법이 확립, 적용하여야 한다. 이들 개체는 다른 개체와 격리하여 사육하면서 다른 개체로의 전파를 차단해야 한다.

외부로부터 새로운 개체를 도입시는 목장 내의 별도의 공간에 일정 기간 격리하면서 혈청 ELISA 및 분변 PCR을 통하여 요네병 음성임을 확인 후 입식 하도록 한다. 수직감염을 차단하기 위해 감염된 개체는 번식을 금지하고 도태시키도록 유도한다. 목장에서는 입식 하는 가축의 수와 목장 내 가축의 요네병 유무 및 검사결과를 상세하게 기록하고 관리하여야 한다. 목장 내 요네병 양성축이 존재한다면 임상증상의 발생 여부 등을 관찰하여 기록하여야 한다. 또한 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지하여 질병 전파의 위험성을 낮추어야 한다.

○ 우군 청정화 프로그램에 따른 목장의 등급 분류 및 사후 관리

요네병 검사 결과에 따른 목장의 등급 분류 및 인증을 위해 일정한 간격으로 주기적인 검사를 시행하여 등급을 분류하도록 하여, 요네병에 대한 목장등급제를 실시하여야 한다. 이러한 목장의 등급제에 따른 경제적 이익을 주었고, 미흡한 목장에는 등급을 높일 수 있도록 여러 가지 제도적, 재정적 지원하여야 한다.

검사 대상은 18개월령 이상의 모든 개체를 대상으로 하며 송아지의 경우에는 18개월령 이상이 되었을 때 검사 대상에 추가하도록 한다. 검사 방법은 개체의 혈청을 대상으로 ELISA법을 사용하며, 또한 분변을 채취하여 IS900 유전자를 대상으로 PCR을 시행한 후 ELISA 와 PCR의 두 가지 결과 중 하나 이상에서 양성이 나온 개체를 최종적으로 양성으로 판정한다. 등급 판정 이후에 양성 개체가 발견되게 되면 등급이 1단계씩 하향 판정을 받게 되며, 양성 개체는 즉각적인 격리 조치 후 빠른 시일 내에 도태시키도록 한다. 이처럼 등급의 하향에 대한 대책을 세울 수 있도록 국가적인 제도적, 재정적 지원이 필수적으로 확립되어야 한다.

○ 맺는말

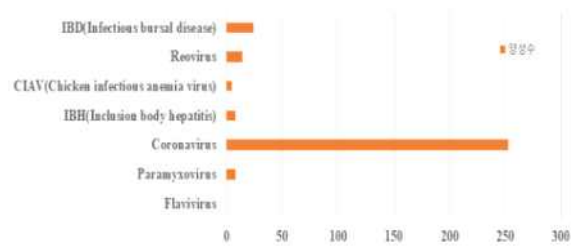
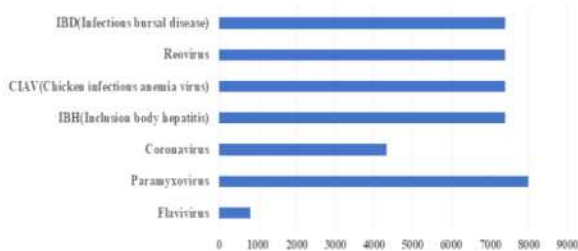
본 연구에서는 국내 요네병 발생 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네 조기진단을 통한 우군 청정화 프로그램을 제안하였다. 국내의 상황을 살펴보면 요네병 발생 건수와 감염 두수가 최근까지도 지속적으로 증가하였으며 이에 따라 경제적 피해도 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 국내 요네병 근절을 위한 우군 청정화 방법의 개발이 시급한 실정이다. 외국의 사례들을 종합해 보면 정기적인 요네병 검진, 송아지로의 수직 전파 차단 및 목장 내의 사육 환경 개선이 공통적으로 확인되었고, 이런 요소들이 요네병 근절에 핵심적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서 이것을 기반으로 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리 대상으로 중점 관리 요소를 설정하여 요네병 근절 프로그램을 제안하였다. 이 프로그램은 목장을 4등급으로 분류하며 정기적인 검진을 통한 양성개체의 조기 탐색 및 제거, 목장내의 위생관리를 통한 체계적인 관리정책을 제시하고 있다. 따라서 이 프로그램의 적용을 통해 요네병에 의한 경제적 피해를 최소화시키며 나아가 요네병을 완전히 근절할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 2-1세부

● 1차년도 : 가금농장 및 야생조류 유래 전염성질병 실태조사 및 특성연구

가) 야생조류 유래 주요 전염성 질병 실태조사

- 주요 철새도래지의 철새분변 시료 확보
- Flavivirus, paramyxovirus, coronavirus와 IBH(Inclusion body hepatitis), CIAV(Chicken infectious anemia virus), Reovirus, IBD(Infectious bursal disease)를 검색함
- 야생조류 총배설강 스왑 및 분변 시료는 신속하게 냉장 보관하여 24~48시간 이내에 검사에 적용할 수 있게 함
- 각 바이러스를 진단하기 위해서 분변시료를 대상으로 RT-PCR 검사를 수행하였으며 이는 동물질병 표준진단요령 및 최신 참고문헌을 참고하여 수행하였음



- Flavivirus는 모든 flavivirus를 검출할 수 있는 Pan-flavivirus 진단법으로 진행하였으며, paramyxovirus, coronavirus도 같은 계열에 속하는 바이러스들을 검출할 수 있는 방법으로 수행하였음. Flavivirus는 800개 시료 중에서 검출되지 않으나, paramyxovirus 8000개 시료 중에서 8개 검출, coronavirus는 4330개 시료 중에서 253개 시료가 양성이었음
- IBH(Inclusion body hepatitis), CIAV(Chicken infectious anemia virus), Reovirus, IBD(Infectious bursal disease)는 multiplex RT-PCR 방법으로 수행하였으며, 7390개 시료 중에서 각각 8, 5, 14, 24개 시료에서 양성이었음

나) 주요 병원체 분리동정

- 선택배지 및 종란을 이용하여 병원체 분리·동정 및 확보

① Paramyxovirus

㉠ 바이러스 분리동정

- 분리재료 : 분변시료

- 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란
- 바이러스 분리 방법
 - 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
 - SPF 발육란 : 분변 상층액을 10일령의 SPF 발육란 AC에 접종한 후 5일 배양하며 계태아의 폐사 등을 관찰한 후 상층액을 회수

② Coronavirus

- ㉠ 바이러스 분리동정
 - 분리재료 : 분변시료
 - 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란
 - 바이러스 분리 방법
 - 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
 - SPF 발육란 : 분변 상층액을 10일령의 SPF 발육란 AC에 접종한 후 5일 배양하며 계태아의 폐사 등을 관찰 한 후 상층액을 회수

③ Reovirus

- ㉠ 바이러스 분리동정
 - 분리재료 : 분변시료
 - 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란
 - 바이러스 분리 방법
 - 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
 - SPF 발육란 : 분변 상층액을 6일령의 SPF 발육란 YS에 접종한 후 3일 배양하며 계태아의 폐사 등을 관찰 한 후 상층액 또는 CAM을 회수; 계태아 간세포 접종 후 3일간 배양

④ IBH

- ㉠ 바이러스 분리동정
 - 분리재료 : 분변시료
 - 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란을 이용한 계태아 간세포
 - 바이러스 분리 방법
 - 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
 - 계태아 간세포 : 분변 상층액을 계태아 간세포에 접종한 후 3~5일 관찰한 후 바이러스를 회수

⑤ CIAV

- ㉠ 바이러스 분리동정
 - 분리재료 : 분변시료
 - 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란
 - 바이러스 분리 방법
 - 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
 - SPF 발육란 : 분변 상층액을 6일령의 SPF 발육란 YS에 접종한 후 14일간 배양하며 계태아의 폐사 등을 관찰 한 후 상층액 또는 계태아

⑥ IBD

- ㉠ 바이러스 분리동정
 - 분리재료 : 분변시료
 - 실험동물 및 세포주 : SPF 발육란
 - 바이러스 분리 방법

- 분변이나 vent 스왑을 무균적으로 채취한 후 유제
- SPF 발육란 : 분변 상층액을 10일령의 SPF 발육란 CAM route로 접종한 후 3일간 배양하며 계태아의 폐사 등을 관찰 한 후 CAM 회수



[Reovirus 바이러스 세포변성(CPE) 및 바이러스 분리·동정]

바이러스명	검사수	양성수	분리동정수
Flavivirus	800	0	0
Paramyxovirus	8,000	8	8
Coronavirus	4,330	253	~
IBH(Inclusion body hepatitis)	7,390	8	~
CIAV(Chicken infectious anemia virus)	7,390	5	~
Reovirus	7,390	14	7
IBD(Infectious bursal disease)	7,390	24	~

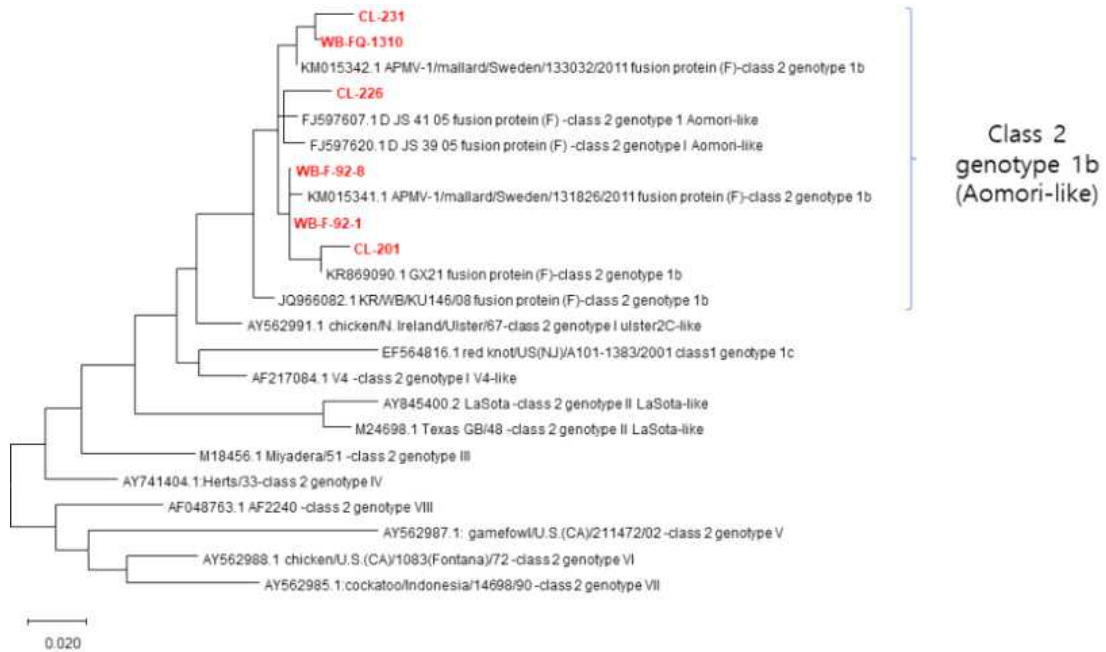
~ : 현재 분리·동정 진행중

다) 바이러스 분리주 유전체 정보 분석

- 분리주 대상 full genome 또는 variable region 염기서열 분석

① Paramyxovirus

- Paramyxovirus 분리·동정 후 시퀀스 분석한 결과, 뉴캐슬병으로 판명되었으며, 주로 class 2 genotype 1b에 속하며 일명 Aomori 유사 계열에 속하는 것으로 분석됨



[Paramyxovirus 계통수 분석]

- 뉴캐슬병의 병원성 여부를 판단하기 위하여 F 단백질의 cleavage site를 분석한 결과, 모두 lentogenic NDV(112GKQGR ↓ L117)로 분석됨(Lentogenic : 112G/E-R/K-Q-G/E-R ↓ L117; Mesogenic and velogenic : 112R/K-R-Q-K/R-R ↓ F117)

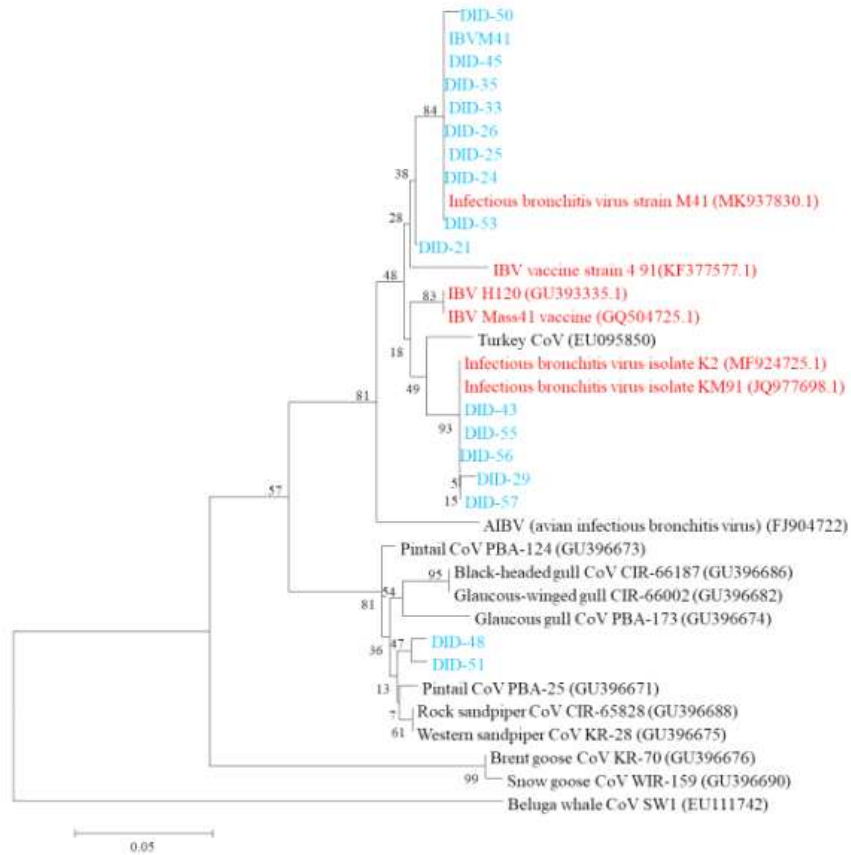
F protein cleavage site (112-117)



[뉴캐슬병 병원성 분석(F protein cleavage site 분석)]

② Coronavirus

- Coronavirus 검출된 시료 중 일부 분리·동정 되었으며, 일부 시료들은 진행중임
- 지역별로 양성수를 살펴보면 전북(61.5%)이 가장 높았으며, 시기별로는 봄(87.5%)이 가장 높았음
- 계통수 분석을 통해서 분리·동정된 코로나바이러스가 avian coronavirus에 속하며 기존의 야생 철새에서 분리·동정된 바이러스와 유사할 뿐만 아니라 일부 바이러스는 백신주와 근연관계에 있음을 확인할 수 있었으며 중국과 한국에 유행하고 있는 바이러스주와 유사한 바이러스가 야생철새에서 확인되었음



[Coronavirus 계통수 분석]

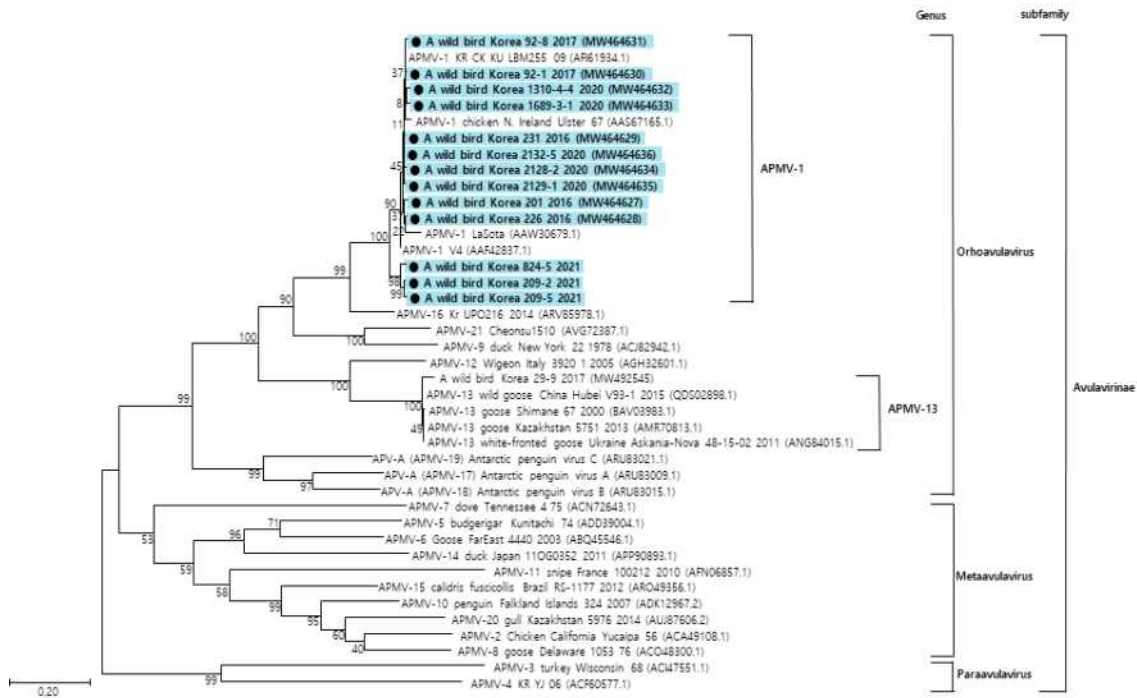
- 2차년도 : 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 상호연관성 규명
- 가) 바이러스 분리주 phylogenetic tree 분석을 통한 연관성분석
 - 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 주요 염기서열 계통분석을 통한 상호 연관성 분석
- ① Paramyxovirus
 - ㉠ Paramyxovirus 유전형 분석

Genotype	Sub/lineage (Aldous et al., 2003)	Sub/genotype (Diel et al., 2012a, 2012b)	Sub/genotype (Dimitrov et al., 2019)
Class I	6	1a	I.1.1
		1b	I.1.2
		1c, 1d	I.2
		I.a	I.1.1
Class II	1	I.b	I.2
		I.c	I.1.2.1
		I.d	I.1.2.2
		II	II
	2	III	III
	3a, 3f	IV	IV
	3b	Vb	V; V.1
	3c	Vc	V.2
		Vd	V
	4bii e	VI.a	VI.2.1.1.1
		VI.n	VI.2.1.1.1
		VI.b	VI.1.1
		VI.e	VI.1.2.2.2
	4b, 4bi	VI.f	VI.1.2.2.1
		VI.h	VI.1.2.1.2
	4bii d	VI.j	VI.2.1.1.2.1
VI.k		VI.2.1.1.2.2	
4c	-	-	
5a	VII.a - one sequence	VII.2	
	VII	VII.1	
5d	VII.b	VII.1.1	
	VII.i	VII.1.1	
5c	VII.l	VII.1.1	
	VII.e	VII.1.1	
-	VII.f	VII.1.2	
-	VII.g (RF)	-	

Genotype	Sub/lineage (Aldous et al., 2003)	Sub/genotype (Diel et al., 2012a, 2012b)	Sub/genotype (Dimitrov et al., 2019)
Class II	5a	VII.h	VII.2
	-	VII.k	VII.2
	5e	VII	VII, VII.2
	3d	VII	VII
	3e	IX	IX
	1	X.a	X
	-	X.b	X
	3g	X.I	X.I
	5b	X.II.a	X.II.1
		X.II.b	X.II.2
	5b	X.III.a	X.III.1.1
		X.III.a	X.III.1.2
		X.III.b	X.III.2.1
	5b	X.III.b	X.III.2.2
		X.IV	X.IV
	5f, 7c	X.IV.a	X.IV.1
		X.IV.b	X.IV.2
	-	X.V (RF)	X.V (RF)
	3d	X.VI	X.VI
	5g, 7a	X.VII.a	X.VII
X.VII.b		X.VII	
7b	X.VIII.a	X.VIII.1	
	X.VIII.b	X.VIII.1.2	
3c	V.a	X.IX	
4a, 4d	VI.c	X.X	
-	VI.l	X.X.I	
-	VI.i	X.X.I.2	
-	VI.q	X.X.I.1.1	
-	VI.m	X.X.I.1.2	

[파라믹소바이러스의 유전형]

- 13개의 분리된 paramyxovirus의 유전자를 분석하여 혈청형을 동정하여 APMV-1으로 판명되었음

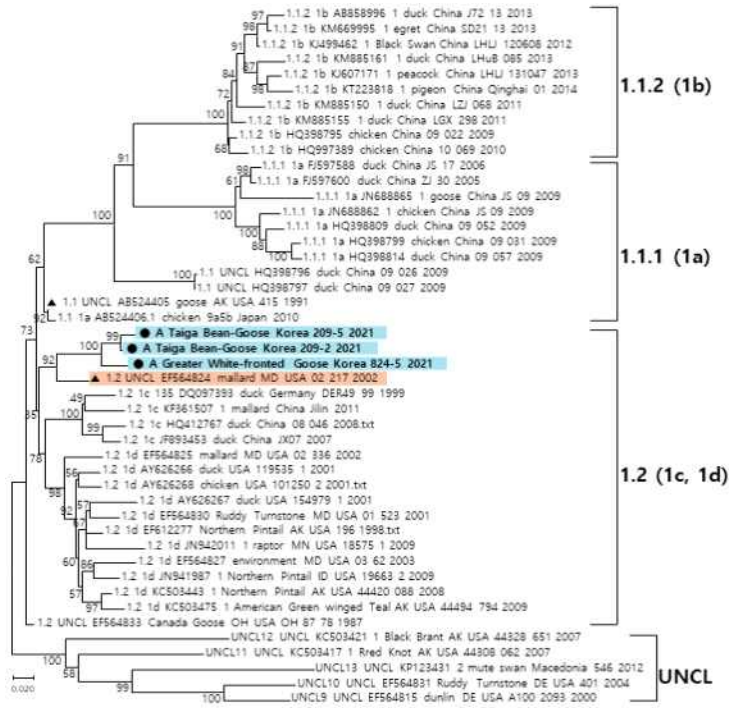


○ 분리된 paramyxovirus의 시퀀스 분석한 결과, 뉴캐슬병으로 판명되었음. 분리된 바이러스의 분변 시료를 분석한 결과, 원앙, 청둥오리, 흰뺨검둥오리, 쇠오리, 큰기러기, 쇠기러기에서 분리됨을 확인하였음. 지역적으로는 충남과 전북에서 분리됨



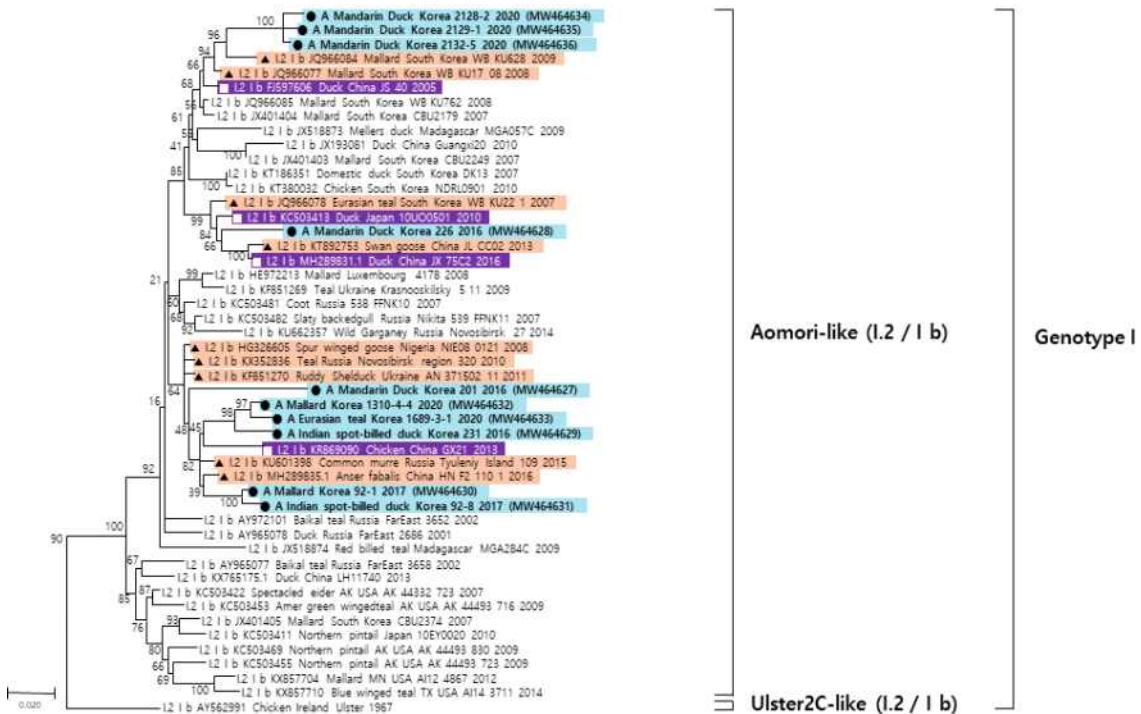
[분리된 paramyxovirus의 숙주 및 지역 분석]

○ Paramyxovirus의 유전형을 분석한 결과, Class I 3개, Class II 10개로 확인되었음. Class I의 genotyping 분석을 수행하였을 때 미국 미네소타 분리주와 연관성을 보였으며 이는 북미 대륙의 전파가능성을 시사함



[Paramyxovirus class I]

- Paramyxovirus의 Class II의 genotyping 분석을 수행하였을 때, 중국, 일본 분리주와 연관성을 보이고, 이를 통해 주변국과 바이러스 교차 가능성을 확인할 수 있습니다. 중국, 일본 분리주들은 가끔 오리에서 분리되었으며, 야생철새에서 가끔으로 전파됨을 시사함



[Paramyxovirus class II]

나) 세균 분리주 PFGE 분석을 통한 연관성 분석

- 가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 PFGE 패턴 및 항생제내성 패턴을 종합분석하여 상호 연관성 분석
- 가금농장에서 분리동정된 살모넬라 티푸스 원인체 *S. enterica* ser. Gallinarum의 항생제 내성 패턴 분석한 결과, 18개 항생제에 대해서 모든 균주들이 최소 3개 이상의 항생제에 대해서 내성이 관찰되었음. 대체내성균임을 확인할 수 있었음

- 모든 균주들은 streptomycin (STR), sulfisoxazole (FIS) and colistin (COL)에 내성을 보였으며, 한 개의 균주는 9개의 항생제에 대해 내성을 보였음. 항생제 내성 패턴을 분석한 결과, STR-FIG-COL-NAL-CP-GEN (18/30, 60.0%) 패턴이 가장 많은 분포를 보였음

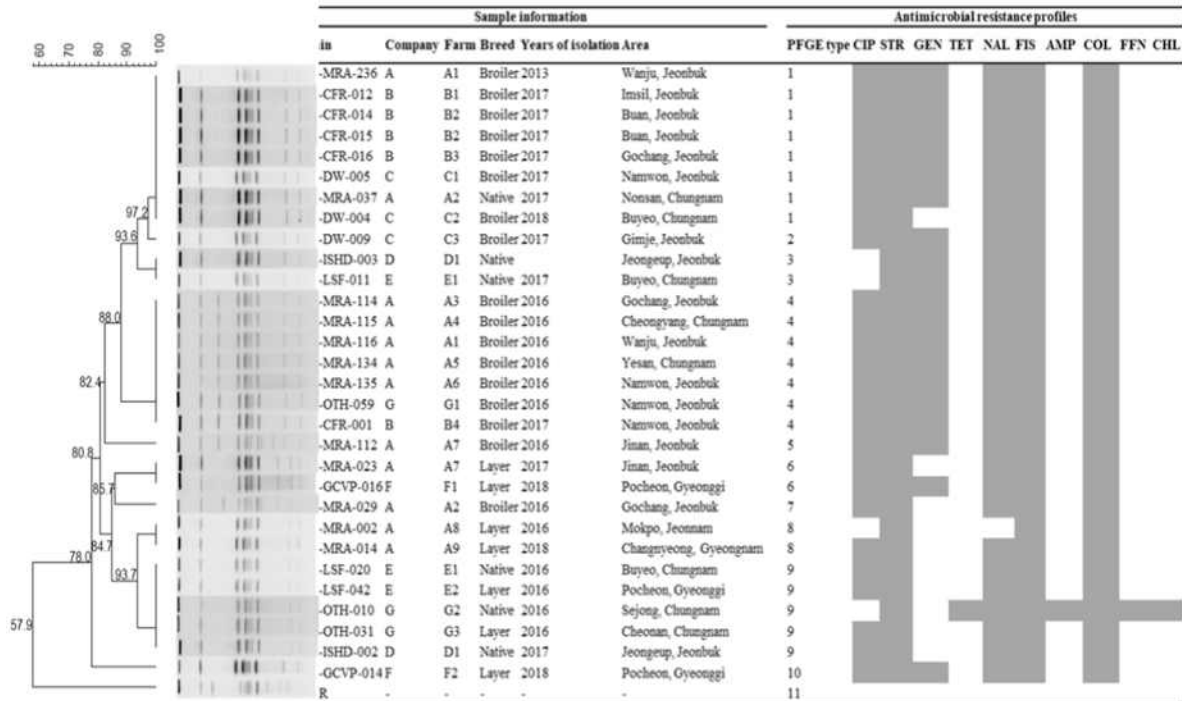
[항생제 내성 패턴 분석]

Isolates	Antimicrobial resistance profile											
	Pattern no.	Antimicrobials ^a										
MRA-236	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-112	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-114	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-115	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-116	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-134	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-135	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
OTH-059	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
LSF-020	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
LSF-042	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
MRA-029	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
OTH-031	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
MRA-002	3	STR	FIS	COL								
OTH-010	4	STR	FIS	COL	NAL	CIP		CHL	AMP	TET	FFC	
CFR-001	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
MRA-037	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
CFR-012	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
CFR-014	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
DW-005	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
DW-009	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
CFR-015	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
CFR-016	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
ISHD-002	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
MRA-023	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
ISHD-003	5	STR	FIS	COL	NAL		GEN					
LSF-011	5	STR	FIS	COL	NAL		GEN					
GCV-014	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
GCV-016	1	STR	FIS	COL	NAL	CIP	GEN					
DW-004	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
-MRA-014	2	STR	FIS	COL	NAL	CIP						
-	-	30/30	30/30	30/30	29/30	27/30	20/30	1/30	1/30	1/30	1/30	
		(100%)	(100%)	(100%)	(96.7%)	(90.0%)	(66.7%)	(3.3%)	(3.3%)	(3.3%)	(3.3%)	

^a STR, streptomycin; FIS, sulfisoxazole; COL, colistin; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin;

CHL, Chloramphenicol; AMP, ampicillin; TET, tetracycline; FFC, florfenicol.

- 분리된 균주들의 PFGE 패턴을 분석한 결과, 주요한 PFGE types은 1형 (8/30, 26.7%)이었으며, 이후로는 4형 (7/30, 23.3%), 9형 (5/30, 16.7%) 순으로 확인되었음. 같은 계열사에서 같은 PFGE가 검출되기도 하였지만, 다른 계열사에서 동일한 PFGE도 확인되었음



● 3차년도 : 닭 호흡기성 질병 동시진단법 개발 및 실증

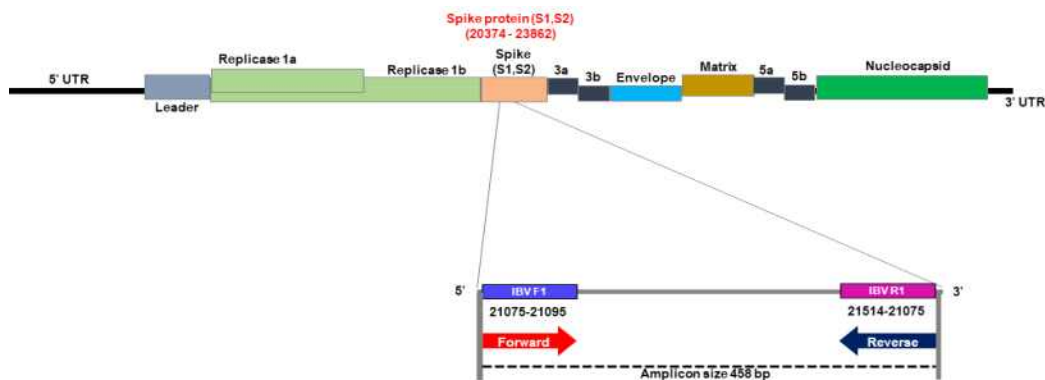
가) 닭 전염성 기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 개발

- 닭 전염성 기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 single PCR 개발 및 민감도/특이도 분석

① 닭 전염성 기관지염 single PCR 개발

⑦ 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정

- Spike protein을 타겟으로 작성함



[Primer 모식도]



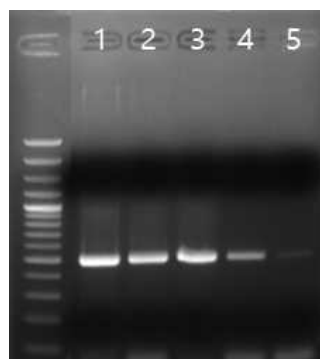
[Primer alignment]

○ 프라이머 작성 및 조건설정

Primer	Nucleotide (5'-3')	Target gene	Size	표준주
IBV F1	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	S gene	458bp	M41
IBV R1	CTCTATAAACACCCTTACA			

PCR Condition		Temp. (°C)	Time	Component	Vol.	Conc.
Initial Denaturation		94	5min	10XPCR Buffer	5ul	
30 cycles	Denaturation	48	90sec	dNTPs Mix	3ul	2mM
	Annealing	72	2min	Primer (F)	1ul	50pmol
	Extension	94	1min	Primer (R)	1ul	50pmol
Final extension		72	5min	DNA Template	10ul	100ng/ul
				nTaq	1ul	5U/ul
				ddH ₂ O	29ul	
				Total	50ul	

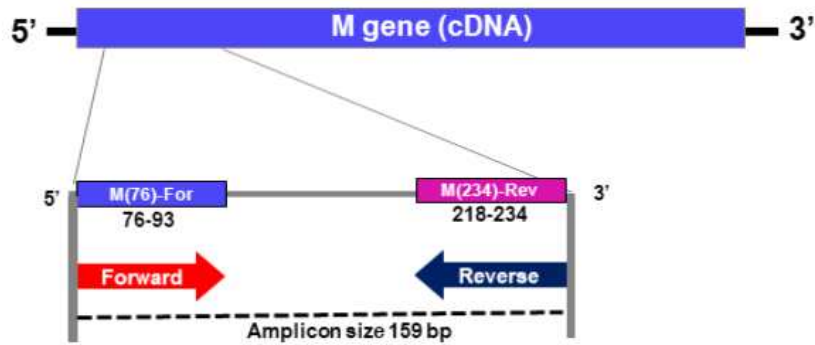
㉠ 민감도 실험



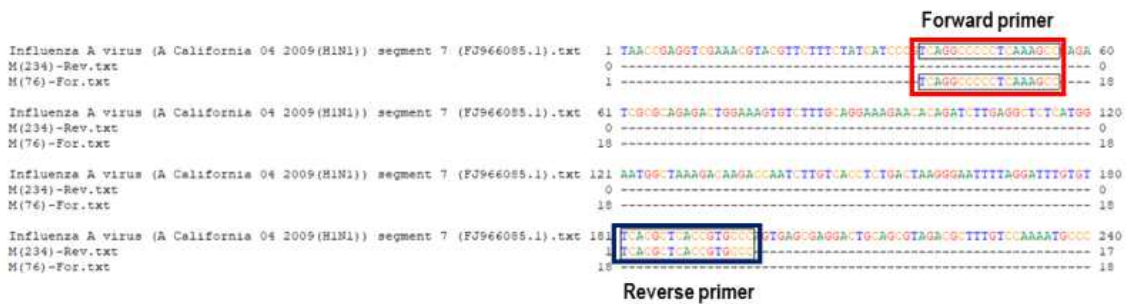
Lane 1 : IBV 10⁻¹
 Lane 2 : IBV 10⁻²
 Lane 3 : IBV 10⁻³
 Lane 4 : IBV 10⁻⁴
 Lane 5 : IBV 10⁻⁵

[닭 전염성 기관지염 PCR 민감도 실험]

- ② 조류인플루엔자 single PCR 개발
 - ㉞ 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정
 - Matrix protein을 타겟으로 작성함



[Primer 모식도]



[Primer alignment]

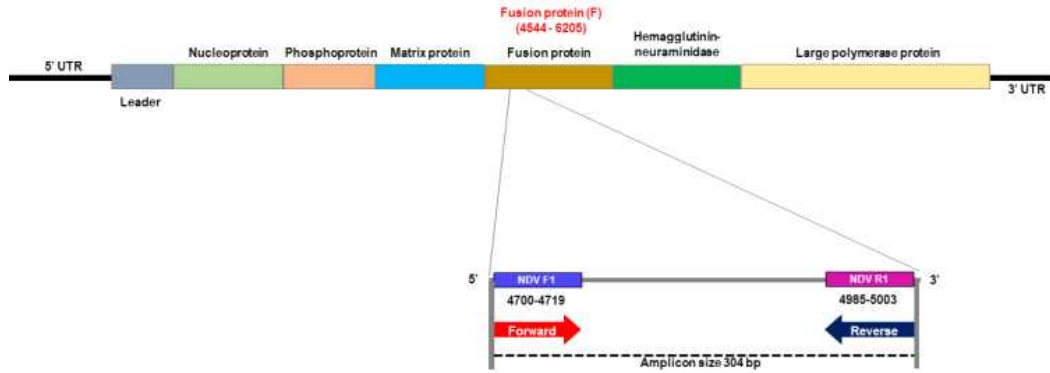
- 프라이머 작성 및 조건설정

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	GGCACGGTGAGCGTGA			

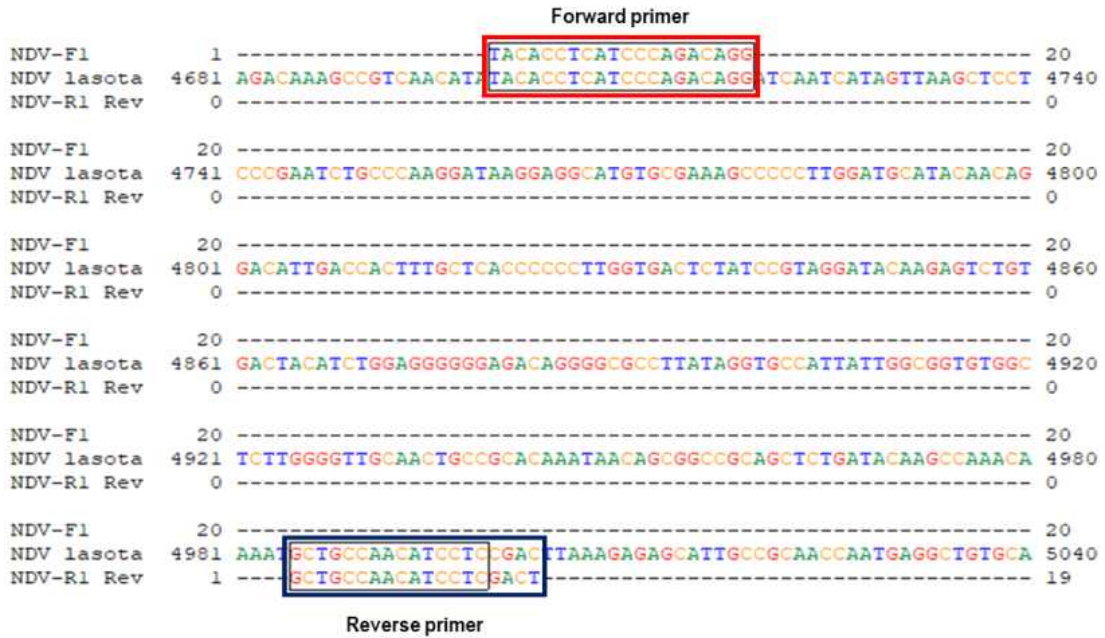
PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		95	5min
40 cycles	Denaturation	95	15sec
	Annealing	54	1min
	Extension	72	15sec
Final extension		72	10min

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	

- ③ 뉴캐슬병 single PCR 개발
 - ㉞ 바이러스 진단 프라이머 작성 및 조건 설정
 - Fusion protein을 타겟으로 작성함



[Primer 모식도]



[Primer alignment]

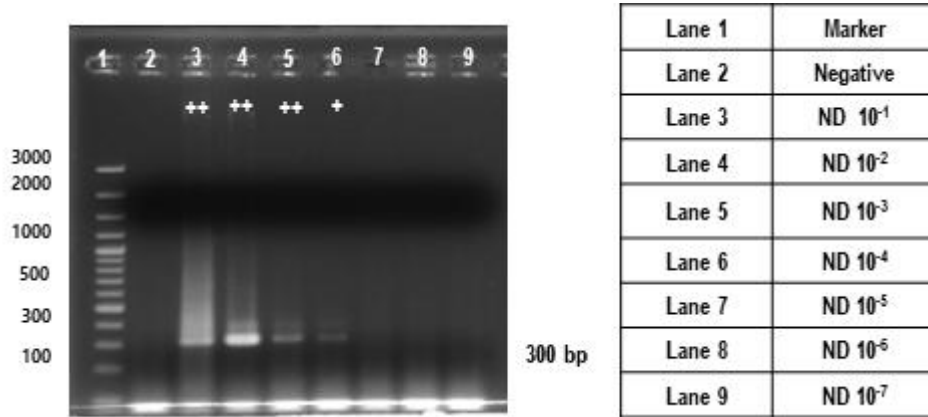
○ 프라이머 작성 및 조건설정

Primer	Sequence(5'-3')	Target gene	Size
NDV F1	TACACCTCATCCCAGACAGG	F gene	300bp
NDV R1	AGTCGAGGATGTTGGCAGC		

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		94	2min
40 cycles	Denaturation	53	1min
	Annealing	72	1min
	Extension	94	20sec
Final extension		72	5min

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

㉞ 민감도 실험



[뉴캐슬병 PCR 민감도 실험]

• Multiplex-PCR 개발 및 민감도/특이도 분석

① 각 single PCR primer를 조합한 multiplex PCR법 세팅 및 조건 설정

Virus	Primer	Nucleotide (5'-3')	Target gene	Target size
IBV	IBV F1	CACTGGTAATTTTTTCAGATGG	S gene	458 bp
	IBV R1	CTCTATAAACACCCTTACA		
AIV	M(76)-For	TCAGGCCCCCTCAAAGCC	M gene	159 bp
	M(234)-Rev	GGGCACGGTGAGCGTGA		
NDV	NDV F1	TACACCTCATCCCAGACAGG	F gene	300 bp
	NDV R1	AGTCGAGGATGTTGGCAGC		

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Pre-denaturation	1 cycle	94	1min
Denaturation	35 cycles	94	30sec
Annealing		55	30sec
Extension		72	30sec
Final extension	1 cycle	72	5min

Component	Vol.
10 X Buffer	2.5
dNTP	2.5
nTaq	0.5
Primer (F)	2
Primer (R)	2
DW	14.5
Template	1
total	25

나) 닭 전염성기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 실증

• 야외분리주 대상 Multiplex-PCR 및 Single-PCR을 비교평가하여 실효성 검증

① 바이러스 야외 분리주 확보

㉞ 닭 전염성 기관지염 야외분리주 확보

○ 검사시료 : 기관, 폐, 신장, 맹장편도

○ 바이러스 분리 실험동물 및 세포주

- 9~11일령 SPF 발육란

○ 바이러스 분리 방법

- 기관, 폐, 신장, 맹장편도 등의 조직을 무균적으로 채취한 후 유제

- 조직유제 상층액을 9~11일령 SPF 발육란의 AC 접종하여 3~7일간 배양한 후 상층액을 회수

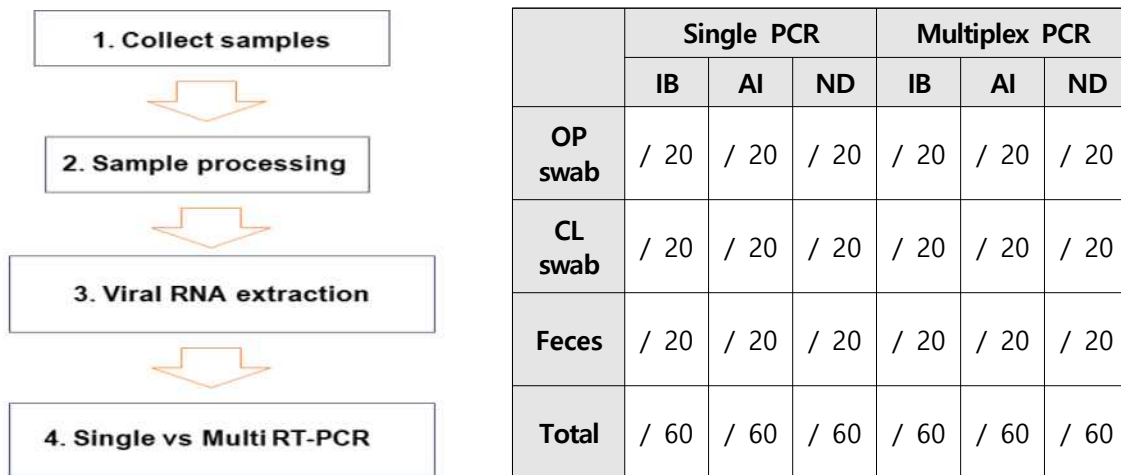
㉠ 인플루엔자 바이러스 야외분리주 확보

- 검사시료 : 기관, 폐, 장, 맹장편도, 비장, 간장 등
- 바이러스 분리 실험동물 및 세포주
 - 9~11일령 SPF 발육란
- 바이러스 분리 방법
 - 기관, 폐, 장, 맹장편도, 비장, 간장 등의 조직을 무균적으로 채취한 후 유제
 - 조직유제 상층액을 9~11일령 SPF 발육란의 AC 접종하여 4~6일간 배양한 후 상층액을 회수하여 혈구응집 유무를 확인

㉡ 뉴캐슬병 바이러스 야외분리주 확보

- 검사시료 : 기관, 폐, 장, 맹장편도, 비장, 간 등
- 바이러스 분리 실험동물 및 세포주
 - 9~11일령 SPF 발육란
 - CEF 또는 CEL
- 바이러스 분리 방법
 - 기관, 폐 등의 시료를 무균적으로 채취한 후 유제(10% 유제액)
 - 조직유제 상층액을 9~11일령 SPF 발육란의 AC 접종하여 4~6일간 배양한 후 상층액을 회수하여 혈구응집 유무 확인

㉢ 야외주 분리주 대상 single PCR와 multiplex PCR법 비교평가



[시료 확보 및 검증 flow]

- 현재 야외주 확보 완료 및 OP/CL swab 시료와 feces 시료를 이용한 PCR 비교 분석 및 실험성 검증 중에 있음

● 4차년도 : 오리 소화기성질병 동시진단법 개발 및 실증

가) 오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 개발

- Multiplex-PCR 개발 및 민감도/특이도 분석

① 오리장염바이러스 감염증

㉠ 오리장염바이러스의 검출 및 유전자 분석

- UL30과 UL31 유전자를 target으로 오리장염바이러스 검출
- 오리장염바이러스에서 100% homology를 보이는 UL30 유전자 full genome를 분석
- 유럽주2회 중국분리주3회로 C-terminal 부근 특이적인 33bp 반복 서열 차이를 지니고 329번 아미노산이 Glutamic acid(유럽주),Aspartic acid(중국분리주)로 보존되어 있는 LORF3 유전자 분석

- LORF11 유전자를 비교하여 N-terminal 901 bp 영역 유(유럽주)무(중국 분리주) 분석

㊤ 바이러스 DNA 분리

- DNA extraction kit 사용(Intron : Viral DNA/RNA Extraction Kit)

㊤ 오리장염바이러스 유전자에 대한 PCR

- 오리장염바이러스 PCR 용 primer set

No.	Target Gene	Primer name	Primer(5'→3')	Size(bp)
1	UL31	DEV D-F	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	446
	UL30	DEV D-R	CAAGGCTCTATTCGGTAATG	
2	UL30	DEV UL30-F	GGCAAACCTGACGTGGACAG	3,728
		DEV UL30-R	ATTTCTGCGCTCACCAATGT	
3	LORF3	DEV LORF3-F	ATTTACACCTCGGCGACAAC	1,507
		DEV LORF3-R	AGAAGCCAGACGAACTACGC	
4	LORF11	DEV LORF11-F	CGAGAGGGCGAGTATTCTGA	3,362
		DEV LORF11-R	GAGCCGAGACTGATTCGTTT	

- 오리장염바이러스 검출용 PCR 조성 및 조건

Component	Vol.	Conc.
10XPCR Buffer	5ul	
dNTPs Mix	2ul	2mM
Primer (F)	2ul	5pmol
Primer (R)	2ul	5pmol
DNA Tamplate	1ul	100ng/ul
eTaq	0.2ul	5U/ul
ddH ₂ O	6.8ul	
Total	20 ul	

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		94	3min
35 cycles	Denaturation	94	30sec
	Annealing	55	30sec
	Extension	72	30sec
Final extension		72	5min

- 오리장염바이러스 분석용 PCR 조성 및 조건 DEV UL3

Component	Vol.	Conc.
10XPCR Buffer	2ul	
dNTPs Mix	2ul	2mM
Primer (F)	2ul	5pmol
Primer (R)	2ul	5pmol
DNA Tamplate	1ul	100ng/ul
eTaq	0.2ul	5U/ul
ddH ₂ O	9.8ul	
Total	20 ul	

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		94	5min
35 cycles	Denaturation	94	30sec
	Annealing	55	30sec
	Extension	72	210sec
Final extension		72	7min

- 오리장염바이러스 분석용 PCR 조성 및 조건 DEV LORF3

Component	Vol.	Conc.
10XPCR Buffer	2ul	
dNTPs Mix	2ul	2mM
Primer (F)	2ul	5pmol
Primer (R)	2ul	5pmol
DNA Tamplate	1ul	100ng/ul
eTaq	0.2ul	5U/ul
ddH ₂ O	9.8ul	
Total	20 ul	

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		94	3min
35 cycles	Denaturation	94	30sec
	Annealing	55	30sec
	Extension	72	80sec
Final extension		72	7min

○ 오리장염바이러스 분석용 PCR 조성 및 조건 DEV LORF11

Component	Vol.	Conc.
10XPCR Buffer	2ul	
dNTPs Mix	2ul	2mM
Primer (F)	2ul	5pmol
Primer (R)	2ul	5pmol
DNA Tamplate	1ul	100ng/ul
eTaq	0.2ul	5U/ul
ddH ₂ O	9.8ul	
Total	20 ul	

PCR Condition		Temp. (°C)	Time
Initial Denaturation		94	5min
35 cycles	Denaturation	94	30sec
	Annealing	55	30sec
	Extension	72	3min
Final extension		72	7min

나) 오리리메렐라 감염증

① 야외주 확보

○ 양성 농장에서 단일균주를 분리하기 위해 다음과 같은 방법으로 분리, 동정을 실시하였음

② 생화학적 특성 분석



[API 20NE test]

- API 20NE(Bio Merieux France) 검사 kit를 이용하여 Oxidase, Catalase, Urease, Indole production 등 20가지 항목을 분석함
- API ZYM 검사 kit를 이용하여 Alkaline phosphatase, Esterase (C4) 등 19가지의 항목에 대해 효소 활성 유무를 확인함

③ 분자생물학적 특성연구

㉞ 16s rRNA 및 OmpA 유전자 분석

- 리메렐라 농장분리주에 대한 유전자 확인 및 상동성을 비교하기 위해 16s rRNA(654bp) 및 OmpA(1119bp) 유전자를 분석하였음

NO.	Primer	Nucleotide (5'-3')	Target gene	Size	표준주	리메렐라 특이 유전자 증폭사진
1	190f	GTATTGAAAGCTCTGGCGG	16s rRNA	654bp	RA21	
	843r	TCGCTFAGTCTCTGAACCC				
2	OmpA-FF	atg ttg atg act gga ctt ggt ct	OmpA	1119bp	RA21	
	OmpA-RR	ctt cac tac tgg aag gtc aga ctt				

[오리리메렐라 유전자 분석 Primer]

다) 오리살모넬라 감염증

- 실질장기(장간막 림프절, 비장 및 간) 또는 분변시료를 멸균 면봉을 이용하여 문지를 후 배지에 도말
- 37°C, 24시간 배양
- MacConkey 배지에서 투명한 집락이나 XLT4 배지에서 중앙부위 검은색 집락을 채취하여 Chrome agar에 계대

① 생화학적 특성 분석

- 생화학동정기(VITEK II [Pullorum, Gallinarum 구분 안됨], API 20E)를 이용하여 동정



[살모넬라 감염증으로 확인된 API 20E 생화학 및 당분해 성상]

- API 20E(Bio Merieux France) 검사 kit를 이용 27가지의 항목에 대해 효소 활성 유무를 확인함

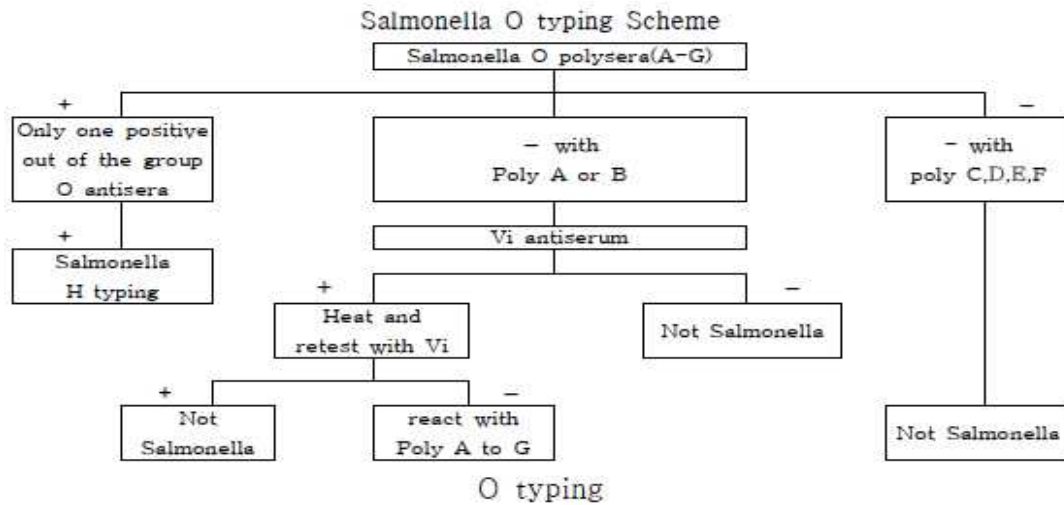
② 살모넬라 PCR 진단

- 살모넬라를 진단할 수 있는 프라이머를 이용하여 진단함
- 살모넬라 검사용 primer set

No.	Target Gene	Primer name	Primer(5'→3')	Size(bp)
1	OMPC	OMPCF	ATCGCTGACTTATGCAATCG	204
		OMPCR	CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	

③ 혈청형 동정 분석

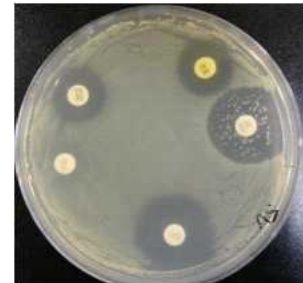
- 항원 O,H typing을 실시



[Salmonella H typing Scheme]

④ 항생제 감수성 조사

- 항균제 (CLSI,2012) 기준에 따라 디스크 확산법으로 실시
- 균 농도를 McFarland no. 0.5로 조정한 후 Mueller-Hinton agar(Difco) 접종
- 항균제에 CLSI(2012)의 기준을 따랐고, 표준균주로 *E. coli* ATCC 25933를 사용함



[항생제 감수성 test]

Aminoglycosides				β-lactam/b-lactamase inhibitor combinations		
Amikacin(An) ≤14 ≥17	Gentamicin(Gm) ≤12 ≥15	Kanamycin(K) ≤13 ≥18	Streptomycin(S) ≤11 ≥15	Amoxicillin/clavulanic acid (Amc) ≤13 ≥18		
Carbapenems		Cephems				
Imipenem (Ipm) ≤139 ≥23		Cefazolin (Cz) ≤19 ≥23	Ceftriaxone(Cro) <19 >23	Cephalothin (Cf) ≤14 ≥18	Ceftazidime(Caz) ≤18 ≥20	Aztreonam(Atm) ≤18 ≥20
Fluoroquinolones			Folate pathway inhibitors			
Ciprofloxacin (Cip) ≤15 ≥21	Norfloxacin (Nor) ≤12 ≥17	Ofloxacin (Ofx) ≤12 ≥16	Sulfisoxazole (G) ≤12 ≥17	Trimethoprim/ sulfamethoxazole (Sxt) ≤10 ≥16		
Penicillins		Phenicols	Quinolones	Tetracyclines		
Ampicillin (Am) ≤13 ≥17	Piperacillin (Pip) ≤17 ≥21	Ticarcillin (Tic) ≤14 ≥20	Chloramphenicol (C) ≤12 ≥18	Nalidixic acid (Na) ≤13 ≥19	Minocycline (Mi) ≤12 ≥16	Tetracycline (Te) ≤11 ≥15

[감수성 시험에 사용한 23종 항생제]

⑤ 병원성 유전자 보유율 조사

- 살모넬라 병원성 유전자 검사용 primer set

No.	Target Gene	Primer name	Primer(5'→3')	Size(bp)
1	invA	invA-F	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244
		invA-R	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	
2	spvC	spvC-1	ACTCCTTGACACAACCAAATGCGGA	571
		spvC-2	TGTCTCTGCATTTGCCCACCATCA	

○ 검사용 PCR 조성 및 조건

Component	Vol.	Conc.	PCR Condition	Temp. (°C)	Time	
10XPCR Buffer	5ul		Initial Denaturation	95	2min	
dNTPs Mix	2ul	2mM	35 cycles	Denaturation	95	45sec
Primer (F)	1ul	10pmol		Annealing	60	45sec
Primer (R)	1ul	10pmol		Extension	72	1 min
DNA Template	1ul	100ng/ul	Final extension	72	5min	
eTaq	0.1ul	5U/ul				
ddH ₂ O	39.9ul					
Total	50 ul					

라) 오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 구축

① Primer set 구축

Pathogen	Target gene	Primer designation	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>duck enteritidis</i>	KMT1	KMT1-F	GTGTGTTGAGCCAATCTGCT	283
		KMT1-R	GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	
<i>S. enterica</i>	invA	InvA-F	CGGCAGAGTTCCCATTGAAA	527
		InvA-R	TTGTCACCGTGGTCCAGTTT	
<i>R. anatipestifer</i>	16s rDNA	190F	GTATTGAAAGCTCTGGCGG	654
		843R	TCGCTTAGTCTCTGAACCC	

② 야외분리주 대상 Multiplex-PCR 및 Single-PCR을 비교평가하여 실효성 검증

Pathogen	No. of cases positive	
	Single PCR	mPCR
<i>duck enteritidis</i>	0	0
<i>S. enterica</i>	63	63
<i>R. anatipestifer</i>	48	48

○ 2-2세부

2-2 세부과제 (전북대 조호성):

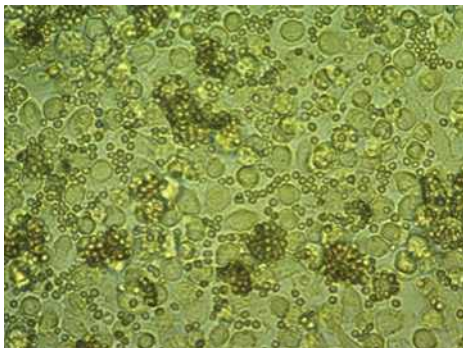
국가재난형 가축질병 모니터링 진단법 개선 및 차단방역 관리 시스템 개발



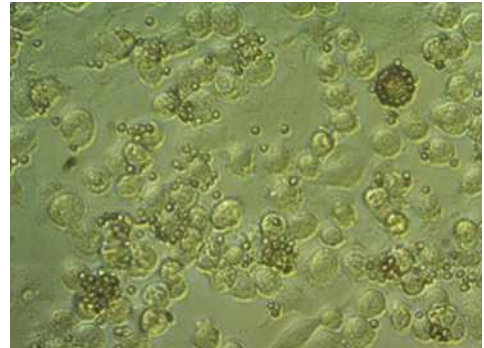
● 1차년도 : 아프리카돼지열병 모니터링을 위한 구강액 검사 시스템 개발

가) 아프리카돼지열병 및 구제역 바이러스의 구강액에서의 검출 시스템 개발

- ASFV 배양 세포주 개발을 통한 바이러스 확보
- SPF 돼지유래 PAM에 대한 베트남 ASFV 분리주 감염 결과는 다음과 같음



[ASFV 접종 3일째 (HAD test)]



[ASFV 접종 4일째 (HAD test)]

- 구강액에서의 바이러스 유전자 추출 방법 최적화
 - 구강액 ASFV spiked sample에서 유전자 추출 키트인 Fecal DNA isolation kit(MO BIO, USA), QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN, USA), Veri-Q Prep M16(Micobiomed, Korea)를 이용한 DNA 추출 후 real-time PCR 분석 결과 유사한 민감도를 보였으나 Veri-Q Prep M16의 사용으로 10배 이상 민감한 것으로 확인됨

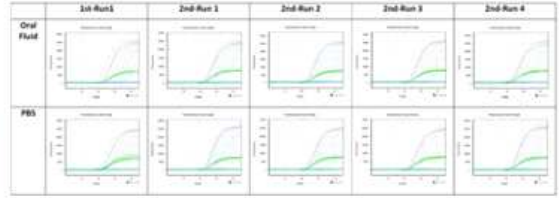
나) 아프리카돼지열병 검출 real-time PCR의 민감도 및 특이도 검증

- 바이러스 구강액 spiked sample에서의 real-time PCR의 민감도 및 특이도 분석
- 민감도 결과 : 구강액내 10² 바이러스 까지 민감하게 검출하였음

Sample NA/SS/rel	PBS (Phosphate-Buffered Saline)						Porcine oral fluid					
	1st PREP	2nd PREP				PN/TN*	1st PREP	2nd PREP				PN/TN*
	Run-1	Run-1	Run-2	Run-3	Run-4		Run-1	Run-1	Run-2	Run-3	Run-4	
Blank	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0/5	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0/5
10 ⁶	19.55	21.11	20.99	20.85	20.92	5/5	19.52	20.82	20.85	20.62	20.67	5/5
10 ⁵	21.60	22.55	22.50	22.55	22.56	5/5	21.97	22.66	22.53	22.56	22.50	5/5
10 ⁴	25.41	25.07	24.77	25.15	24.97	5/5	25.96	25.27	25.07	25.12	25.11	5/5
10 ³	28.20	27.63	27.81	27.69	27.50	5/5	28.41	27.87	27.79	27.57	27.91	5/5
10 ²	32.12	30.79	30.41	31.47	30.39	5/5	31.62	31.09	31.01	31.32	31.02	5/5
10 ¹	34.74	33.16	33.12	35.21	32.78	5/5	34.97	33.19	33.76	32.89	33.00	5/5
10 ⁰	N/D	35.83	36.09	N/D	35.43	3/5	36.14	N/D	36.00	35.03	N/D	3/5
10 ⁻¹	no test	no test	no test	no test	N/D	0/1	no test	no test	no test	no test	N/D	0/1
PC	21.78	21.89	21.89	21.62	21.54	--	22.00	21.72	21.59	21.73	21.59	--
NC	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	--	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	--

*PN= Positive number (양성 결과 개수)
TN= Total number (총 실험 개수)

- 검출 목표인 10³ 보다 100배 낮은 10¹ 에서 100% 검출 확인.
- 10⁰ 에서도 총 5회 중 3회 검출됨을 확인.



<구강액과 PBS내에서의 ASFV에 대한 rel-time PCR 결과>

- 특이도 결과 : 특이도 평가 대상 병원체와 결과는 다음과 같으며 모두에서 검출되지 않았음

No.	Organisms	Target		
		1st run	2nd run	3rd run
1	Positive Control	21.7	21.75	21.89
2	Zika virus	N/D	N/D	N/D
3	<i>Plasmodium falciparum</i>	N/D	N/D	N/D
4	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	N/D	N/D	N/D
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N/D	N/D	N/D
6	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	N/D	N/D	N/D
7	<i>Legionella pneumophila</i>	N/D	N/D	N/D
8	<i>Escherichia coli</i>	N/D	N/D	N/D
9	Human whole blood	N/D	N/D	N/D
10	Metapneumovirus	N/D	N/D	N/D
11	Parainfluenza 1	N/D	N/D	N/D
12	Parainfluenza 2	N/D	N/D	N/D
13	Parainfluenza 3	N/D	N/D	N/D
14	Parainfluenza 4	N/D	N/D	N/D
15	Dengue virus type 1	N/D	N/D	N/D
16	Dengue virus type 2	N/D	N/D	N/D
17	Dengue virus type 3	N/D	N/D	N/D
18	Dengue virus type 4	N/D	N/D	N/D
19	Japanese encephalitis virus	N/D	N/D	N/D
20	Respiratory syncytial virus A	N/D	N/D	N/D
21	Adenovirus type B	N/D	N/D	N/D
22	Rhinovirus	N/D	N/D	N/D
23	Coronavirus HKU-1	N/D	N/D	N/D
24	Coronavirus OC43	N/D	N/D	N/D
25	Coronavirus 229E	N/D	N/D	N/D
26	Coronavirus NL63	N/D	N/D	N/D
27	Influenza type A H1	N/D	N/D	N/D
28	Influenza type A H3	N/D	N/D	N/D
29	Influenza type A H5	N/D	N/D	N/D
30	Influenza type A H7	N/D	N/D	N/D
31	Influenza type B	N/D	N/D	N/D
32	Porcine whole blood	N/D	N/D	N/D
32	Classical Swine Fever Virus (LOM strain)	N/D	N/D	N/D
33	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (VR2332[ATCC VR2332])	N/D	N/D	N/D
34	Pseudorabies virus (PRV)(PRV YS-strain)	N/D	N/D	N/D
35	Porcine Circovirus 2 (CBNU-VCD strain)	N/D	N/D	N/D
36	Porcine Parvovirus (ATCC VR 742))	N/D	N/D	N/D

● 2차년도 : 아프리카돼지열병의 구강액 모니터링 시스템 현장 적용 시험

가) 아프리카돼지열병바이러스(ASFV) 감염 동물실험을 통한 구강액 real-time PCR 검사법 검증(베트남 NIVR 공동연구)

- ASFV 접종 실험을 통한 구강액 검출 real-time PCR 검사법의 유효성 검증
 - 베트남에서 이유자돈 20마리를 각각 둘로 나누어 ASFV 접종군(10마리) (ASFV_NgheAn_2019, 10^6 HAD₅₀/ml)와 비접종대조군(10마리)를 대상으로 감염 5일째 구강액을 채취하여 real-time PCR을 통해 결과를 비교하였음
 - real-time PCR 비교 결과 구강액에서 베트남에서 이유자돈 20마리를 각각 둘로 나누어 ASFV 접종군(10마리)와 비접종대조군(10마리)를 대상으로 감염 5일째 구강액을 채취하여 real-time PCR을 통해 결과를 비교하였음

[ASFV 감염 돼지 구강액에서의 real-time PCR을 통한 유전자 검출 결과]

No.	시료종류	검사방법	결과(Ct)
1	Pig G1-1(PC)	real-time PCR	23.45
2	Pig G1-2(PC)	real-time PCR	27.32
3	Pig G1-3(PC)	real-time PCR	27.82
4	Pig G1-4(PC)	real-time PCR	24.62
5	Pig G1-5(PC)	real-time PCR	22.83
6	Pig G1-6(PC)	real-time PCR	29.23
7	Pig G1-7(PC)	real-time PCR	24.59
8	Pig G1-8(PC)	real-time PCR	25.85
9	Pig G1-9(PC)	real-time PCR	24.26
10	Pig G1-10(PWC)	real-time PCR	25.37
11	Pig G2-1(NC)	real-time PCR	N/D
12	Pig G2-2(NC)	real-time PCR	N/D
13	Pig G2-3(NC)	real-time PCR	N/D
14	Pig G2-4(NC)	real-time PCR	N/D
15	Pig G2-5(NC)	real-time PCR	N/D
16	Pig G2-6(NC)	real-time PCR	N/D
17	Pig G2-7(NC)	real-time PCR	N/D
18	Pig G2-8(NC)	real-time PCR	N/D
19	Pig G2-9(NC)	real-time PCR	N/D
20	Pig G2-10(NC)	real-time PCR	N/D

[ASF 양성 및 음성 양돈장 돼지에서 무작위 추출식 및 전수 혈액 검사 결과와 구강액 검사 비교]

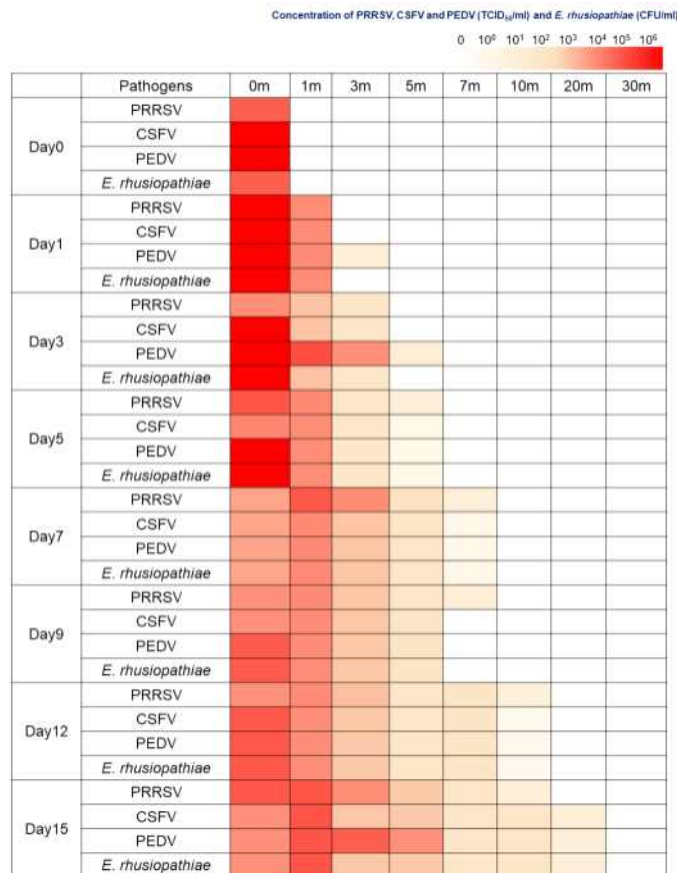
Pig farm	Herd (n)	Positive rate (n, %)		
		Random sampling (n=5)	Total sampling (n=30)	Oral fluid
ASF positive	Weaner (30)	0/5 (0%)	2/30 (6.7%)	+
	Grower (30)	1/5 (20%)	5/30 (16.7%)	+
	Finisher (30)	0/5 (0%)	3/30 (10.0%)	+
	Sow (30)	0/5 (0%)	4/30 (13.3%)	+
ASF negative	Weaner (30)	0/5 (0%)	3/30 (10.0%)	-
	Grower (30)	0/5 (0%)	3/30 (10.0%)	-
	Finisher (30)	0/5 (0%)	3/30 (10.0%)	-
	Sow (30)	0/5 (0%)	3/30 (10.0%)	-

● 3차년도 : 국가재난형 가축전염병 차단방역 매뉴얼의 효율성 개선 연구

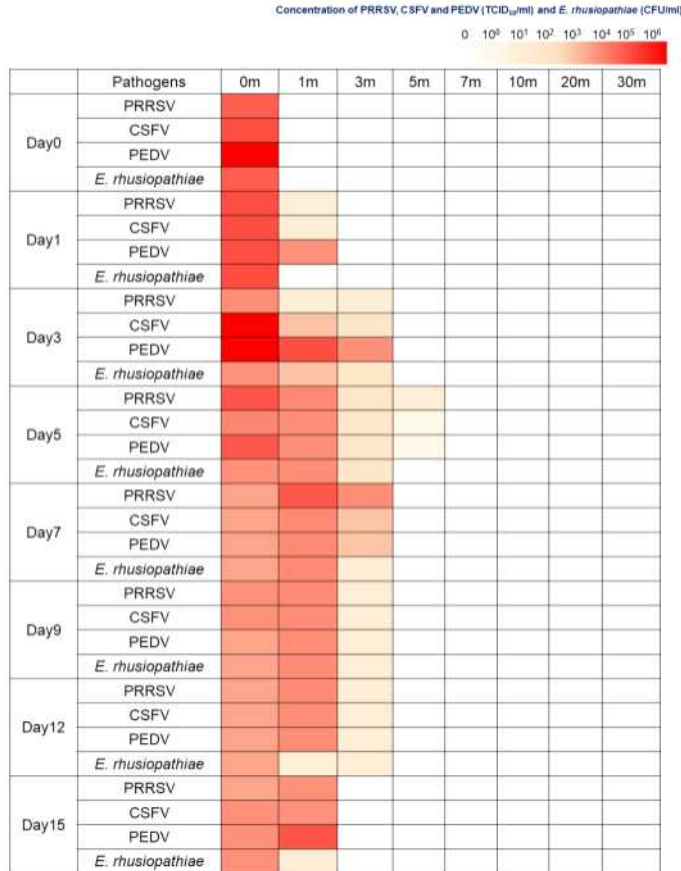
가) ASFV 농장내 유입 요인 차단을 위한 절차의 과학적 근거 마련

- ASFV 농장내 유입을 차단하는 강화된 방역시설(7대방역시설)에 대한 타당성 부여를 위한 과학적 검증
- 특히 방역당국과 양돈장 간의 이견이 가장 많은 방역 시설인 전실의 차단방역 효과에 대한 과학적 근거 마련이 필요
- 결과는 다음과 같음

- ① 전실이 설치되지 않은 돈방에서의 병원체 확산 결과는 그림 1과 같음. 병원체는 복도를 따라 지속적으로 확산되어 15일에는 20미터까지 확산되는 결과를 확인하였음
- ② 기능 중심의 절충안의 전실이 설치된 돈방에서의 병원체 확산 결과는 그림 2와 같음. 병원체는 복도를 따라 5미터 까지 확산되는 결과를 확인함
- ③ 전실이 원래의 규격대로 설치된 경우의 돈방에서의 병원체 확산 결과는 그림 3과 같음. 병원체는 도포 지역을 중심으로 거의 확산 되지 않는 결과를 보여줌



[그림 1. 전실 설치 없는 돈방에서의 병원체들의 확산 결과]



[그림 2. 기능에 중심을 전실(절충안) 설치 돈방에서의 병원체 확산 결과]



[그림 3. 전실이 설치된 돈방에서의 병원체 확산 결과]

나) 아프리카돼지열병 차단방역 매뉴얼에 대한 효율성 개선 : ASF SOP에 대한 분석 및 현장적용시의 문제점 해결 방안 마련

- ASFV SOP 중 농장내 유입을 차단하는 강화된 방역시설(7대방역시설) 중 양돈 농가의 이해를 돕기 위한 근거를 마련하는 내용의 연구가 진행되어야 하며 이를 기반으로 SOP의 타당성을 강화하여야 함

● 4차년도 : 국가재난형 가축전염병 관리를 위한 농장 및 지역 위험도 평가 시스템 개발 및 활용

가) 아프리카돼지열병 차단방역을 위한 농장 내부 및 외부 위험도 평가 기준 설정

- 아프리카돼지열병 발생 농장 및 지역의 위험도 평가를 통한 평가 시스템 개발

① 양돈장 차단 방역 조치

- 축산 농가에 막대한 피해를 야기하는 가축전염병의 병원체가 농장으로 유입되는 것을 방지하기 위해서는 병원체가 농장안으로 들어오는 것을 차단하고, 가축이 있는 축사 안으로 들어오는 것을 막는 시스템을 구축하는 것이 중요함.
- 농장의 차단방역을 위한 시스템에는 방역시설이나 장비와 같이 하드웨어적 요소와 위험이 예상되는 대상에 대한 차단-세척-건조-소독 등 방역 관리와 같은 소프트웨어적 요소가 있음.
- 돼지 농장에 대한 ASF 방역상의 위험 평가는 상기의 방역시설 및 장비와 함께 방역 관리에 대한 평가가 필요함. 다만, ASF 발생 농장의 경우에는 방역 관리에 대한 평가가 불가능한 상황으로 이 경우에는 우선 방역시설 및 장비에 대하여 평가할 수 있을 것임.

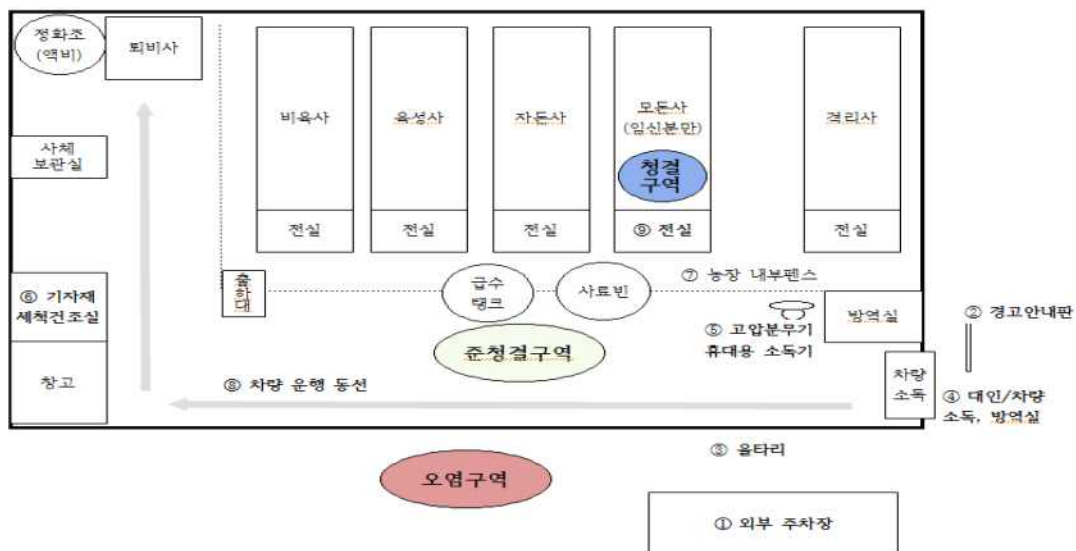
⑦ 위험요인의 접근 가능성에 따른 구역 설정

가) 오염구역 : 농장을 구분하는 경계 외부 영역으로 모든 차량, 사람, 물품 및 야생동물 등이 농가로 접근할 수 있는 통제되지 않은 영역

나) 준청결구역

- 농장 내부 중 농장 운영에 필수 불가결하게 출입이 필요한 차량의 출입이 허용되는 구역으로 출입시 반드시 차량 소독을 거쳐서 들어올 수 있는 구역
- 준청결구역은 필수요소는 아니며 농장의 상황에 따라 구역 설정을 하지 않아도 되며 농장을 오염과 청결 두 구역으로 나누어 관리하여도 충분하다는 의견이 있음(차량이 농장으로 진입시 출입구에서 소독을 충분히 실시)

다) 청결구역 : 농장내에서 질병에 감수성이 있는 가축이 머물고 있는 축사와 그에 딸린 전실 등 부속시설을 포함하는 영역



[그림 4. 양돈농장의 위험에 따른 구역 설정]

② 양돈장 ASF 위험 평가 기준

- 위험도 평가는 (1단계) 시설기준 평가와 (2단계) 농장 방역관리 이행 평가로 구성되며, 1단계 평가가 완료된 경우에만 2단계 평가를 받을 수 있음

㉠ (1단계) 시설 기준 평가

- 양돈농가 시설기준 대한 위험 평가는 농장내로 바이러스가 유입되는 잠재적인 경로를 따라 농장 입구-농장내부-돈사입구-돈사 및 기타 순서로 구성
- 시설기준은 총26개의 항목으로 구성되어 있으며, 그중 필수시설 12개, 부가시설 14개로 구성
- 필수시설은 하나라도 설치되어있지 않을 경우 기준을 충족하지 못하며, 부가시설은 4개 이상 설치되지 않은 경우 기준을 충족하지 못한 것으로 함

③ (2단계) 방역관리 이행 평가

- 양돈농가 방역관리 이행 평가 평가는 농장 전체에 대한 방역 프로그램(P)에 대한 영역과, 농장의 구역(오염-준오염-준청결-청결)의 각 영역에서 이행해야하는 관리사항 순서로 구성
- 전체 35개 항목으로 구성되어 있으며, 그중 필수 이행항목은 20개, 부가적인 이행항목은 15개로 구성
- 필수 이행사항은 하나라도 제대로 이행되지 않을 경우 기준을 충족하지 못하며, 부가적인 이행사항은 5개 이상 이행하지 않았을 경우 기준을 충족하지 못한 것으로 함
- 평가받은 농장에 방문하여 실제 방역관리가 제대로 이행되고 있는지 등을 살펴보고 정성적으로 판단되는 사항을 구체적인 내용으로 기술하고 최종적으로 적부 여부를 기록함

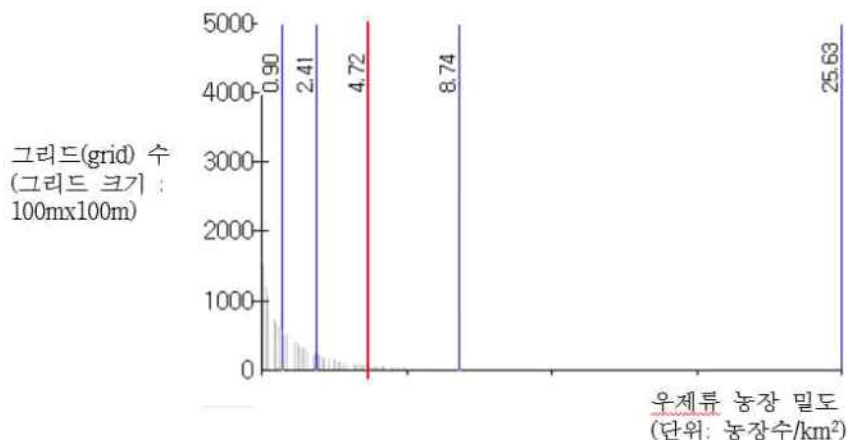
나) 국가재난형 가축질병 제어를 위한 밀집 사육 지역 집중 관리 방안 수립

- ① 아프리카돼지열병 및 구제역 등 국가재난형 가축질병 발생 농장 분석을 통한 밀집 사육 농장 및 지역의 공간 분석을 통한 위험도 평가

② 아프리카돼지열병 및 구제역 등 국가재난형 가축질병 관리를 위한 차별화된 방역 매뉴얼 보완

㉠ 우제류 농장 사육 밀도 분석 결과

- 가) 우제류 사육 농가의 위치 정보를 기반으로 한 사육밀도 분석 결과로는 국내 우제류 사육 농장(총 127,806농가 18,889,732두) 밀도 분포를 분석한 결과는 그림 5와 같음
- 나) 농장 밀도의 평균 값이 일부 고밀도 지역의 영향으로 오른쪽으로 치우쳐 있는 패턴(positive skewed)으로 나타났는데 이는 중위수 보다 평균이 오른쪽에 있다는 의미임. 대부분의 지역은 밀도가 낮았고 밀도가 높은 지역이 적게 분포하는 패턴이었음
- 다) 밀도 분포는 5개의 그룹으로 분류할 수 있었으며 평균 1.25농장/km² (표준편차 1.66, 최소:0 ~ 최대 25.63), 중위수는 4.72(농장수)/km² 이었음(그림 5)



[그림 5. Natural break 클러스터 방법을 이용한 사육밀도 구분]

㉠ 우제류 밀집사육 단지 방역 관리 방안

가) 밀집 단지 특화 방역 관리 방안의 필요성

- 밀집사육단지로 선정된 52곳의 우제류 사육 단지에 대한 차단 방역 강화 방안이 필요함
- 방역 관리 측면에서의 우제류 밀집 사육 단지는 최근 구제역이 발생하였거나 방역 여건이 열악하여 구제역이 발생할 경우 대규모 확산이 우려되기 때문에 집중관리가 필요하며 이에 대한 관리 강화 방안이 수립되어야 함
- 한편 우제류 밀집 사육 단지의 경우 몇 가지 유형으로 분류될 수 있는데 첫째, 통제가 용이한 밀집사육 단지로 대부분 반경 300미터 이내에 농장이 밀집되어 있고 한 개 또는 두 개의 진출입로 되어 있어 집중적인 방역 조치를 취하기 적합한 단지가 있고 둘째, 다수의 도로로 구획되어 있어 복합 통제 방안이 필요한 밀집사육 단지로서 대부분 반경 1km내에 농장이 분포되어 있는 형태가 많았고 농장 사이에 일반 농가가 분포되어 있을 뿐 아니라 국도에 의해 구분되어 형태인 단지, 셋째, 다수의 농가가 반경 2km이상의 지역에 넓게 분포되어있고 고속도로와 같은 큰 도로로 구분되어 있어 방역 조치가 다수의 지역으로 분산되어 적용되어야 하는 단지로 구분할 수 있었음
- 따라서 우제류 밀집사육 단지에 특화된 방역 관리 강화 방안에 대한 문제점과 제한점 및 해결 방안 등을 제시하고자 함

* 밀집 사육 단지 방역 대책

- 단지내 차량 통행 방식 단일화 : 단지내 출입구를 통일시켜 단지로 들어오는 입구와 출구를 지정하고 단지 출입시 소독 절차를 철저히 준수하도록 조치함
- 단지내 통행권 발급을 통한 차량 통제
- 단지 경계 구역의 완충 공간 조성 : 단지 외곽 전체에 울타리 설치가 가능한 단지에 효과적으로 적용 가능함. 이 경우 사유 재단의 공동관리 부분의 동의 등 현실적인 문제가 발생할 수 있음. 또한 단지 내 주민(일반인/외국인 포함) 공동 방역교육(정기) 및 공동 컨설팅(수의사 의무 강화)
- 단지내 방역 책임자 의무화 : 방역 책임자 선정 절차 및 비용 부담 등 현실적인 문제 해결 선행이 필요

○ 2-3세부

● 1차년도 : *H. longicornis*의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library 의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색

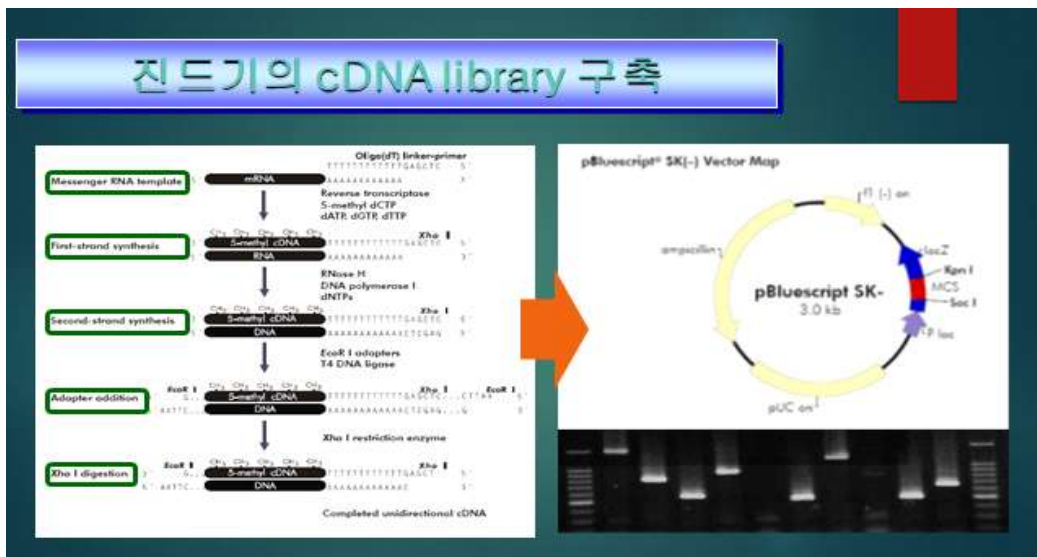
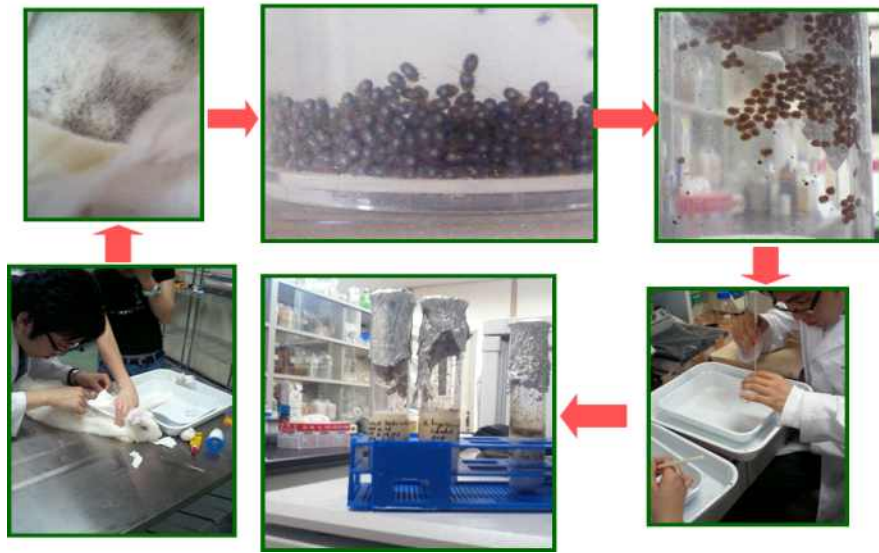
가) 실험실내 *H. longicornis* 의 배양

- 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 system의 구축
- 진드기의 동정
- 진드기의 생활사 유지를 위한 흡혈시스템의 구축

- 토끼에 진드기를 다양한 방법을 통하여 접종한 후 흡혈을 마친 진드기들은 탈피, 산란 등의 과정을 거쳐 생활사 다음 단계로 진행한다. 본 내용에서는 생활사의 구축을 위한 기본적인 내용을 제시함

나) *H. longicornis* 유전자 full length cDNA library 의 구축

진드기의 실험실내 계대 배양



- 실험실내 계대를 통하여 진드기 *H. longicornis* 성충의 cDNA library 구축

다) *Haemaphysalis longicornis* 게놈 라이브러리 구축

- K-mer 분석 결과
 - 진드기 게놈 크기는 약 2.6Gbp로 전체적인 K-mer 수와 볼륨 피크를 이용하여 측정됨

[Table 1. K-mer analysis result]

	K-mer coverage	Heterozygosity	Genome length	Genome repeat length
21mer	59.94	3.139	2,630,667,008	1,320,594,359

- K-mer coverage : The mean k-mer coverage for heterozygous bases
- Heterozygosity : The overall rate of heterozygosity
- Genome length : The inferred genome length
- Genome repeat length : The length of the genome that is repetitive

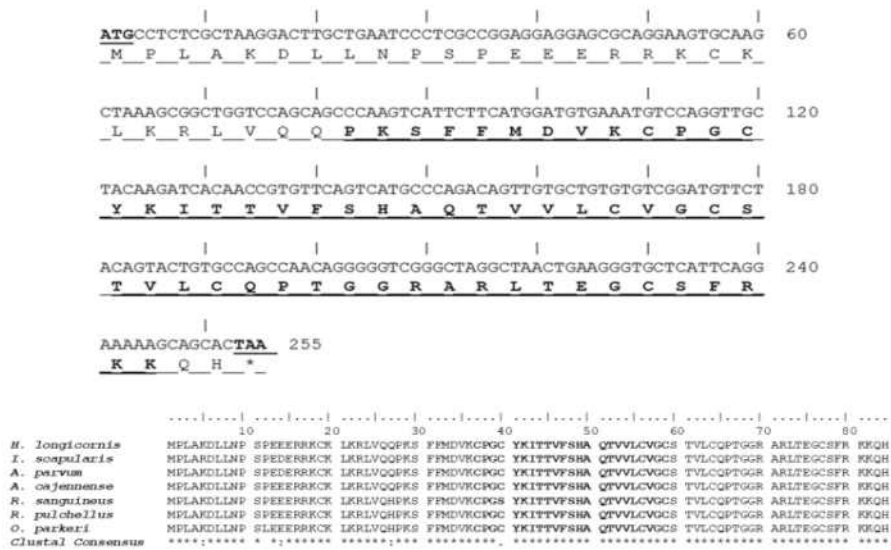
[Table 2. Assembly summary of contig]

Contigs	Total contig bases	N50	Max length	Min	Mean length
95,402	17,261,553	157	9,161	149	180

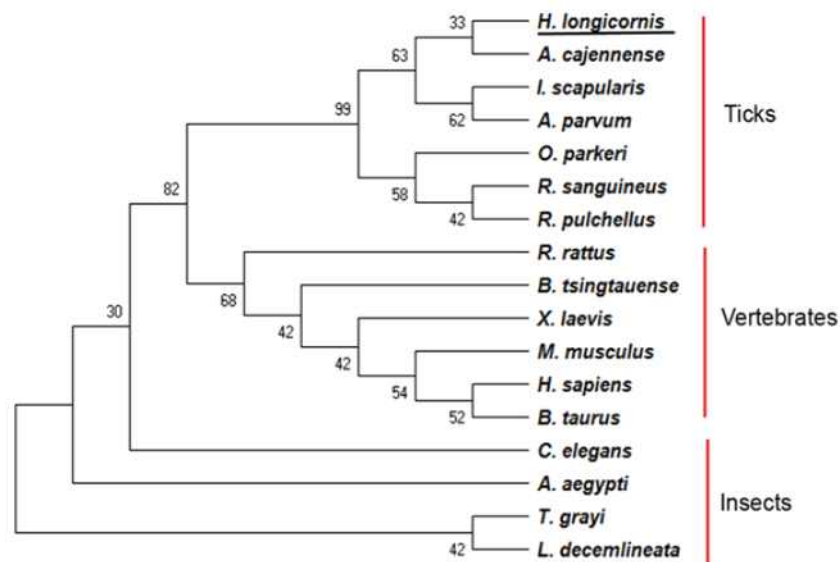
- Contigs : The number of contigs assembled
- Total bases of contigs : The total length of contigs
- N50 : 50% of all contig bases come from contigs longer than this value
- Max length : The length of the longest contig
- Min length : The length of the shortest contig
- Mean length : The average length of contigs assembled

라) degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색

- RPS-27 유전자의 동정과 분석



[그림 1. Haemaphysalis longicornis RPS-27 유전자의 동정과 유사도 분석]



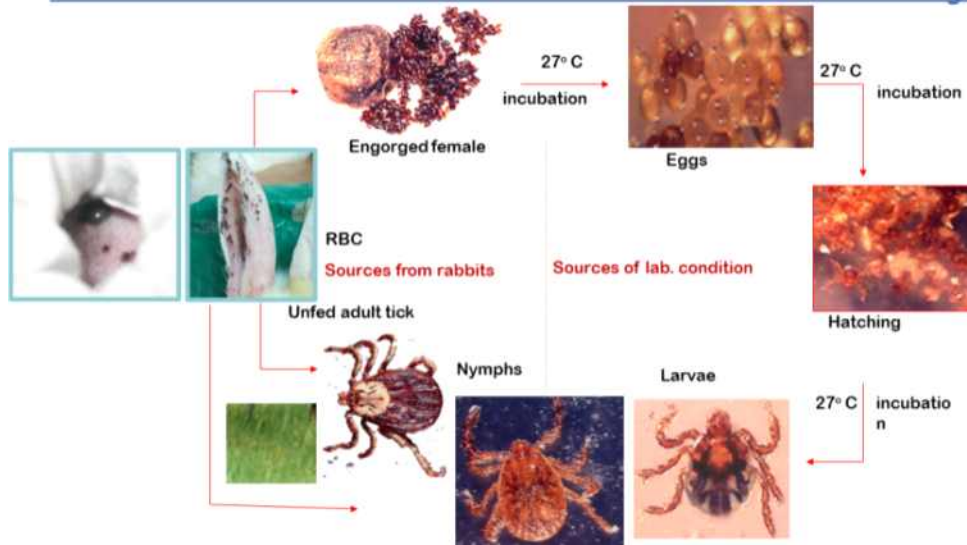
[그림 2. Phylogenetic analysis of RPS-27 from H. Longicornis and othe species]

● 2차년도 : 숙주의 면역반응을 유도하는 진드기 유래 생리활성유전자의 탐색

가) 진드기배양시스템의 유지

- 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 진드기 배양 system의 유지
- 진드기의 생활환의 유지를 통한 진드기 실험을 위한 유전자원의 확보와 함께 수시 배양을 통한 진드기 성충, 약충, 유충 및 알 단계를 각각 확보하여 진드기 유래 생리활성유전자의 탐색을 위한 재료로 활용

Continuous maintenance of tick culture system



나) 면역스크린법에 의한 진드기 유전자 탐색 및 생리활성유전자의 동정

- Screening 결과 및 sequencing 결과 분석

[Table 3. Rabbit No.와 관련된 Colony No. 3회 감염 후 토끼의 혈청 No.1~6을 가지고 28번에 screening 작업에 따른 colony No.1~28]

Rabbit No.	Colony No.
1	1, 2, 13, 14, 15, 16
2	3, 4, 5, 6
3	7, 8, 9, 10, 11, 12
4	17, 18, 19, 20
5	21, 22, 23, 24
6	25, 26, 27, 28

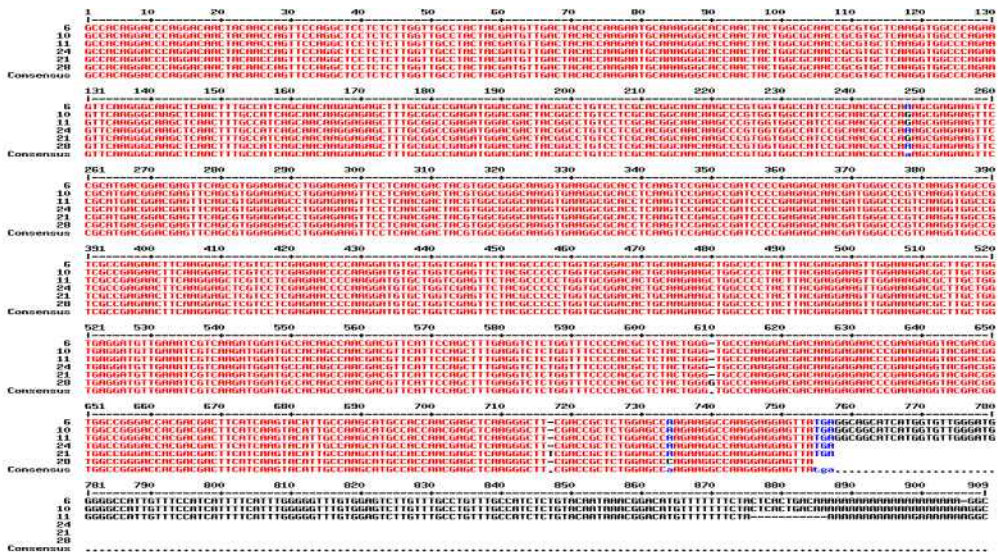
- 본 실험에서 총 28개의 colony가 얻어 졌고 이 전부 sequencing 되었다. 28개의 cDNA sequences 결과를 얻었고 이 중에서 colony sequence가 일치하는 것은 4종류가 나타남

[Table 4. 분자량에 따른 colony 별 비교]

cDNA size	Colony No.
909 bp	6, 10, 11, 21, 24, 28
1904 bp	12, 14, 20, 23
897 bp	17, 22, 26
763 bp	4, 18
일치 없음	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 13, 15, 16, 19, 25, 27

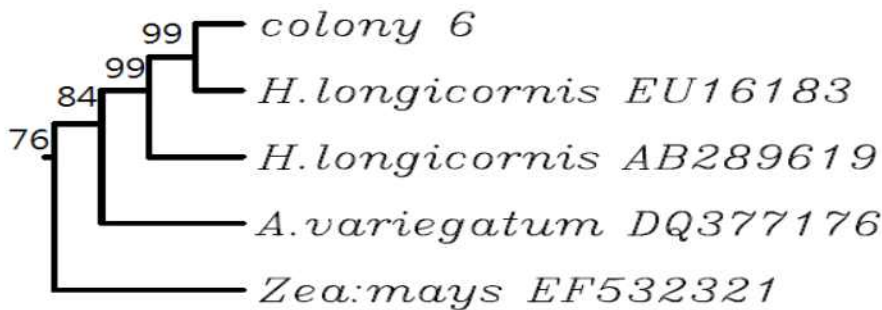
다) 항원 제시 능력에 대한 분석

- 상동성에 따른 항원 분석 결과



[그림 3 Colony 6, 10, 11, 21, 24, 28 sequence 비교 결과]

- 909bp의 colony 6은 GenBank에서 비교결과 isomerase와 대부분 일치 함

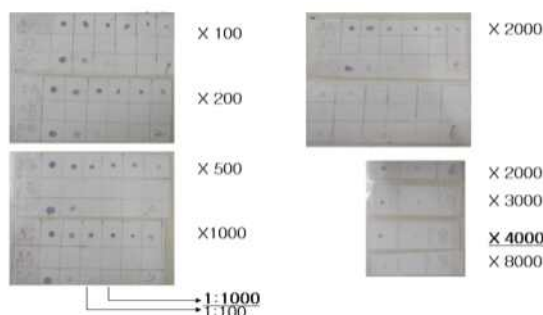


[그림 4. Colony 6과 유사한 종과 유사도 비교]

- 유전자를 탐색하여 sequencing 한 결과, isomerase, mitochondrial ribosomal protein과 ribosomal protein 2가지 총 4가지의 일치되는 결과를 나타냄
- 909bp을 가진 isomerase가 6개의 colony가 일치하여 높은 민감도를 보였다. 6개의 colony(Colony No. 6, 10, 11, 21, 24, 28)는 6마리의 토끼 중에서 4마리(Rabbit No. 2, 3, 5, 6)의 항체와 반응하여서 항원으로서 높은 가치를 나타냄

- 1902bp, 897bp 와 763bp을 가진 ribosomal protein은 각각 4가지(12, 14, 20, 23), 3가지(17, 22, 26), 2가지(4, 18) colony와 일치 하였고, 이것은 각각 4마리(1, 3, 4, 5), 3마리(4, 5, 6), 2마리(2, 4) 토끼의 혈청에 반응하여서 항원으로서의 가치를 나타냄

• Dot blot test에 따른 항원 분석 결과



[그림 5. Dot blot test에 따른 항원성]

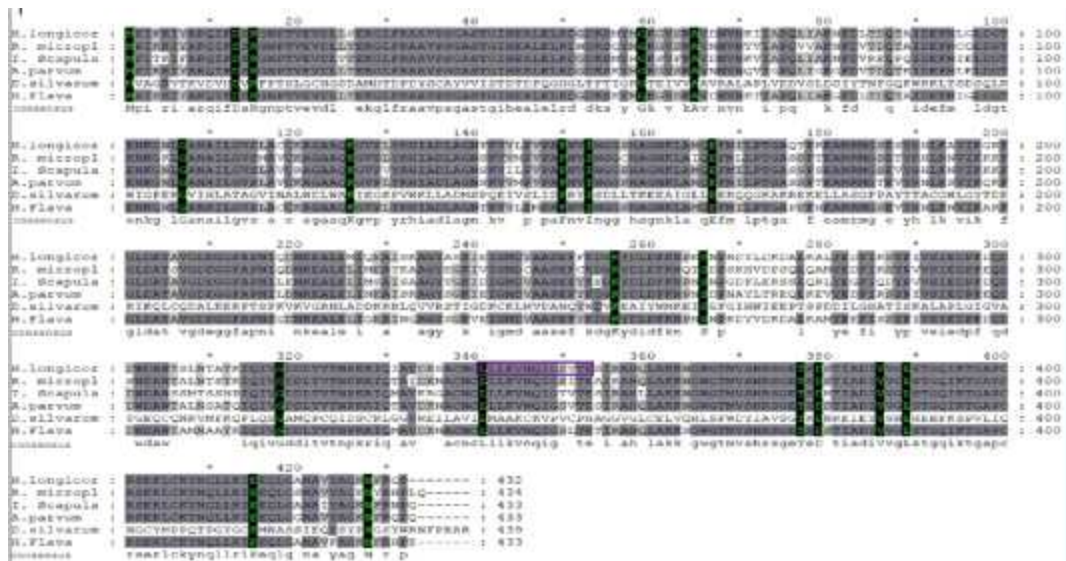
- Colony로부터 확보한 유전자의 항원성을 확인하기 위하여 Membrane을 토끼 1차 항체 control(1:0) 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000을 사용하였고, 그 중에서 1:4000과 1:8000의 차이가 나타났다. 그러므로 1차 항체의 농도가 1:4000이상 사용하여야 감지됨을 확인하여 본 연구에서 얻은 유전자가 항원성이 있음을 확인

라) 요약

- 진드기를 구제하기 위해서 진드기 유래의 유전자를 발현하여 항원으로 면역을 형성하여 억제하는 방법이 효과적
- 진드기의 토끼의 혈청(1차 항체)를 이용하였으며, 28개의 생리활성 유전자를 얻음
- 생리활성유전자는 909 bp를 가진 isomerase 1가지와 1904bp, 897bp, 763bp을 가진 ribosomal protein 3가지로 나타남
- Isomerase의 경우, 6마리의 토끼 혈청 중 4마리가 일치하여 높은 반응성을 보였고 비슷한 일본 종인 *Haemaphysalis longicornis* protein disulfide isomerase-3(HIPDI-3)과 99%로 높은 유사도 보임
- somerase는 흡혈 시에 증가하는 protein으로서 백신에 효과적인 후보가 될 것임
- Ribosomal protein의 경우도 각각 4, 3, 2 마리 토끼 혈청과 반응하여 높은 반응성을 보였고 현재 오스트랄리아 및 남미(Tick-Guard)에서 사용되는 백신도 ribosomal protein에서 유래한 것으로 ribosomal protein 또한 백신 후보로서의 가능성은 상당히 크다고 할 수 있음
- 3차년도 : 재조합 유전자의 숙주에 대한 면역 정상검사

가) 진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기 유전자 분석

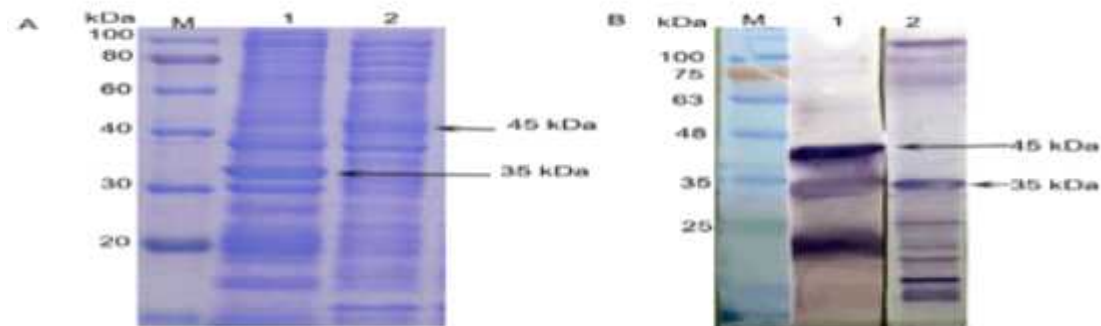
- 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 진드기 배양 system의 유지
- ① 실험실내 *H. longicornis* 의 배양
 - 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 진드기 배양 system의 유지
 - 진드기의 생활환의 유지를 통한 진드기 실험을 위한 유전자원의 확보와 함께 수시 배양을 통한 진드기 성충, 약충, 유충 및 알 단계를 각각 확보하여 진드기 유래 생리활성유전자의 탐색을 위한 재료로 활용



[Phylogenetic analysis of Enolase from *H. longicornis* and other species]

- 본 연구실에서 진드기의 Enolase 유전자의 동정과 함께 관련종과의 유전자의 상동성을 분석함

나) 생리활성 유전자의 발현 및 정제시스템 구축



[SDS-PAGE and western blot analyses of recombinant RPS-27 in pGEMEX-2 vector]

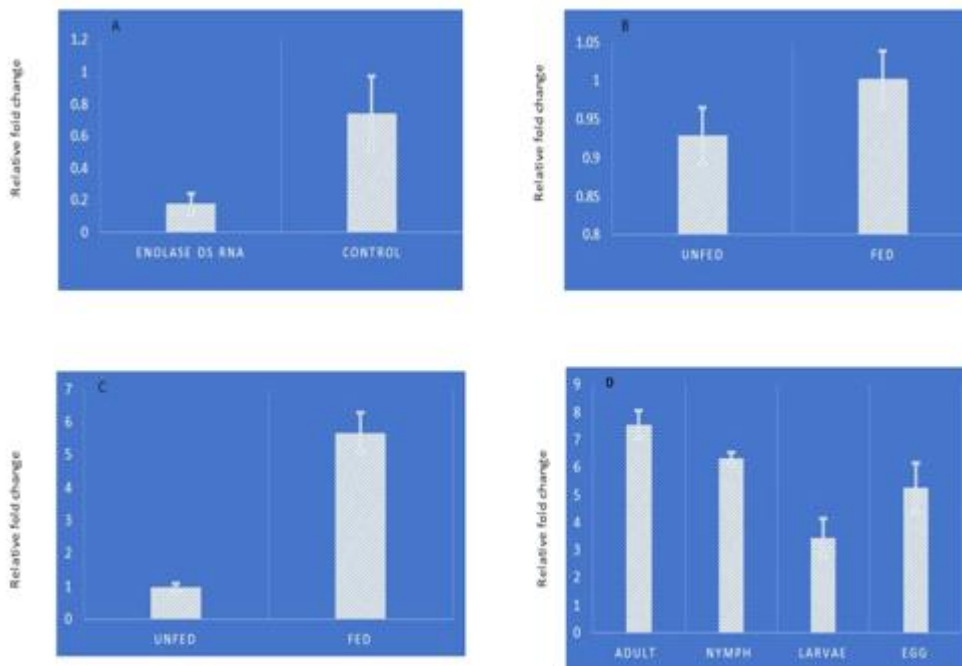
- A) SDS-PAGE analysis of recombinant RPS-27 expressed in pGEMEX-2 vector. Lane M, protein marker; lane 1, only pGEMEX-2 vector; lane 2, pGEMEX-2-RPS-27 detected by CBB staining
- B) Western blot analysis of recombinant RPS-27. Lane M, protein marker; lane 1, pGEMEX-2-RPS-27; lane 2, only pGEMEX-2 vector detected by AP conjugated goat anti-mouse antibody

- 본 연구실에서 진드기의 RPS-27 유전자의 pGEMEX-2 vector에서의 발현시스템의 확인을 통한 발현단계의 확인
- 진드기의 생활환에서 RPS-27 유전자의 pGEMEX-2 vector에서의 발현을 통한 진드기 실험을 위한 진드기 성충, 약충, 유충 및 알 단계를 각각 확보하여 진드기 유래 생리활성유전자의 탐색을 위한 재료로 활용

다) 단백질 발현에 따른 영향분석



[Changes in tick morphology after Enolase dsRNA interference]



[Transcriptional and silencing profiles of Enolase gene]

- 단백질의 발현연구와 관련하여 유전자발현을 억제된 것을 확인하고 억제증장보다 침샘을 섭취한 성충 암컷에서 유의하게(P<0.05) 더 높았음
- 본 연구의 유전자 발현관련 연구는 Enolase 유전자 Knockdown 진드기가 대조군과 비교하여 그들의 흡혈후 무게, 번식에서 유의하게 발현과 관련되어 작용 되었음을 보여줌
- *H. longicornis*에서 Enolase를 인코딩하는 cDNA의 ORF를 확인하고 발현 상태는 다른 조직 수준에서 뿐만 아니라 다른 생활 단계에서 평가되었고, enolase의 기능적 특성은 RNA 간섭에 의해 평가됨
- 흡혈한 침샘에서 에놀라제 전사의 현저하게 높은 발현과 그에 따른 유전자 침묵은 흥미롭게도 진드기 흡혈과 번식을 지연시킨 것을 확인함

라) 결론

- In vitro 발현 및 관련된 분석은 먼저 *H. longicornis*에서 Enolase의 완전한 ORF를 확인함
- Enolase 뉴클레오티드 및 상응하는 아미노산 서열 분석은 이들이 상이한 종들 사이에서 고도로

보존되어 있음을 나타냄

- 단백질의 발현은 중장보다 침샘을 섭취한 성충 암컷에서 유의하게($P < 0.05$) 더 높았음
- 본 연구의 유전자 발현관련 연구는 Enolase 유전자 Knockdown 진드기가 대조군과 비교하여 그들의 흡혈후 무게, 번식에서 유의하게 발현과 관련되어 작용되었음을 보여줌
- 백신 전략과 관련된 항원 개발에서 Enolase의 향후 연구는 진드기 백신개발에 대한 더 깊은 이해와 진드기 제어 전략 개발에 기여할 것

◎ 4차년도 : 생리활성단백질의 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증

가) 진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기 유전자 분석

- 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 진드기 배양 system의 유지

① 실험실내 *H. longicornis* 의 배양

- 본 연구실에서 진드기의 동정, 진드기의 생활환을 유지할 수 있는 진드기 배양 system의 유지
- 진드기의 생활환의 유지를 통한 진드기 실험을 위한 유전자원의 확보와 함께 수시 배양을 통한 진드기 성충, 약충, 유충 및 알 단계를 각각 확보하여 진드기 유래 생리활성유전자의 탐색을 위한 재료로 활용

나)재조합 항원을 통한 면역 증강

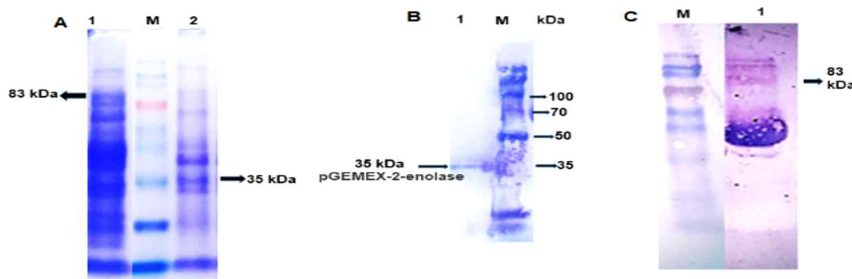
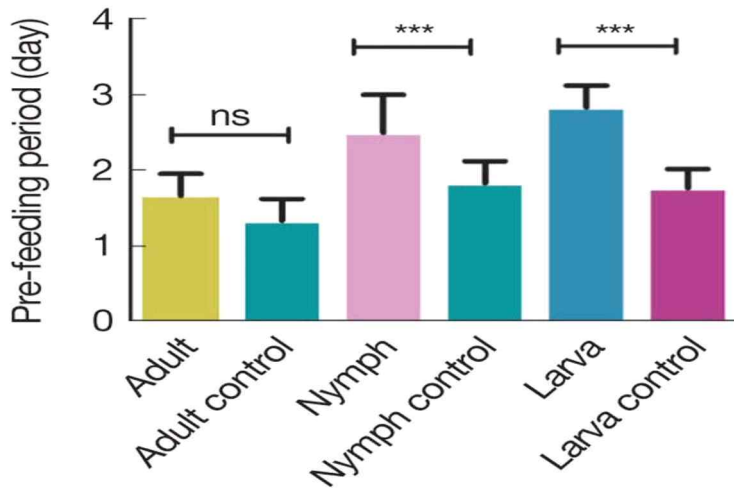


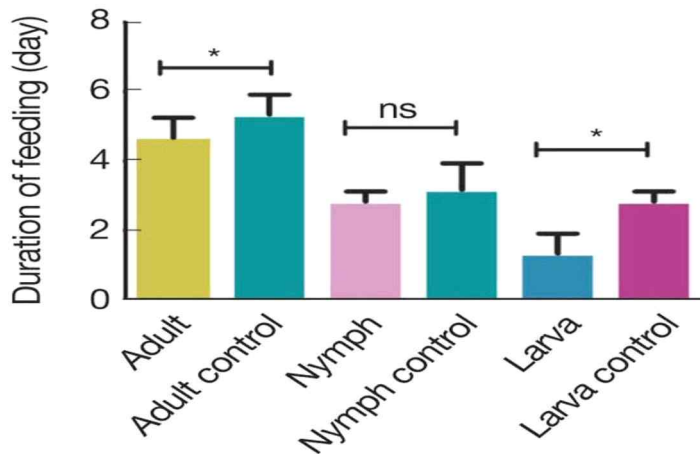
그림. SDS-PAGE and western blot analyses of recombinant enolase expressed from the pGEMEX-2 vector. A) SDS-PAGE analysis of recombinant enolase expressed from the pGEMEX-2 vector. Lane M, protein marker; lane 1, pGEMEX-2-enolase detected by CBB staining; lane 2, only pGEMEX-2 vector; B) Western blot analysis of recombinant enolase. Lane M, protein marker; lane 1, pGEMEX-2-vector; C) Lane M, protein marker; lane 1, pGEMEX-2-enolase; detected by APconjugated goat anti-mouse antibody.

- 재조합 에놀라제는 *E. coli* 숙주 시스템 내에서 pGEMEX-2 벡터(10-enolase)를 사용하여 생산되었다. 재조합 에놀라아제 단백질(10-enolase)은 유전자 10과 유전적으로 융합되었으며, 이후 SDS-PAGE 겔 전기영동을 통한 분석을 통해 발현된 재조합 단백질(rH1Eno)은 이소프로필 β-D-1 이후 대략 83-kDa의 분자량을 갖는 것으로 나타났다. 티오갈락토피라노사이드(IPTG) 유도 재조합 10-에놀라제 단백질의 존재를 추가로 확인하기 위해 항마우스 에놀라제 면역 혈청을 사용하여 단백질 분석을 수행했는데, 이는 특정 단백질을 판별하는 데 활용되었다.

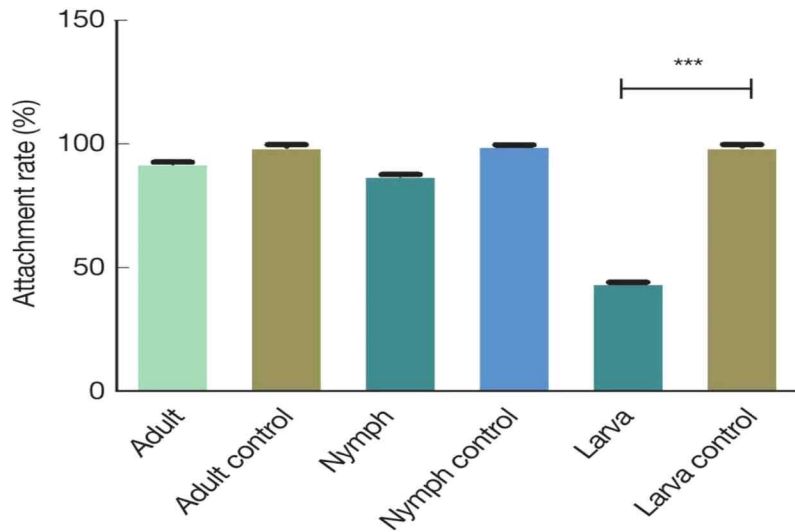
다)재조합 항원을 통한 백신기술 확보



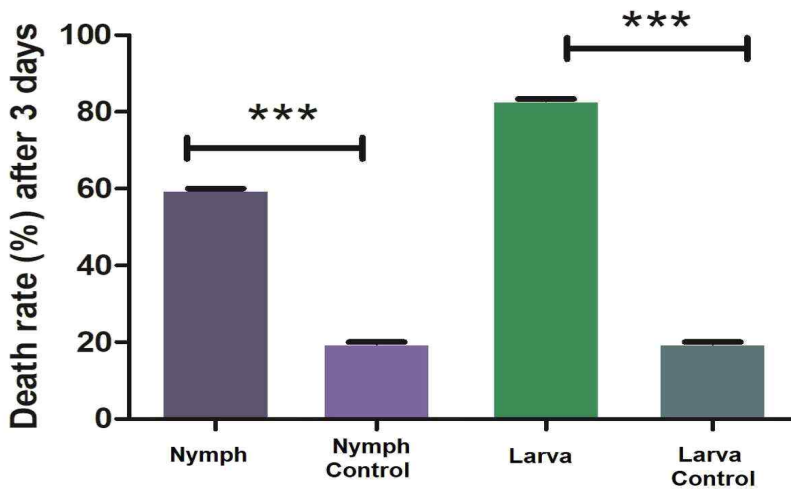
- 재조합 에놀라아제 단백질(rHIEno)로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에서 다양한 발달 단계(성충, 약충 및 유충)의 작은소참진드기의 Pre-feeding period(마우스에 부착하여 흡혈을 시작하기까지의 시간) 분석 결과이다. 성충을 제외하고, 약충(Nymph)과 유충(Larva)에서 두 그룹 간에 유의한 차이(***; $P < 0.0001$)가 관찰되었다. Adult, Nymph, Larva: 각각 rHIEno로 면역된 마우스에 감염시킨 성체, 약충, 유충 진드기; Adult control, Nymph control, Larva control: 각각 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에 감염시킨 성체, 약충, 유충 진드기.



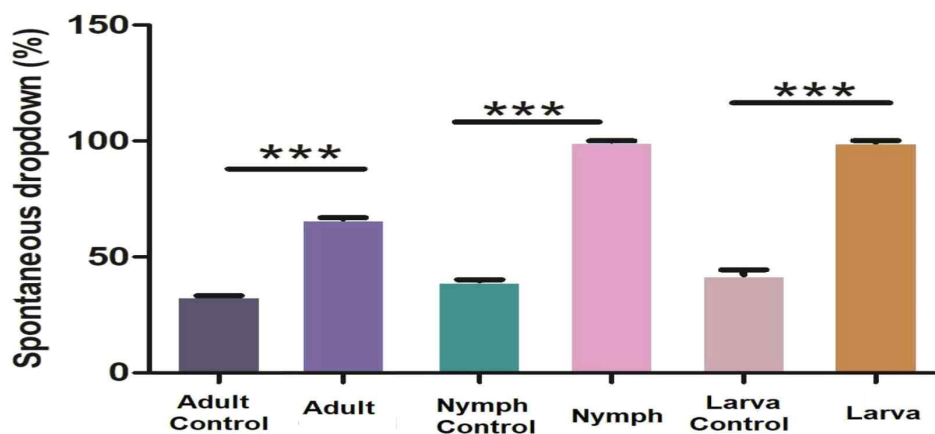
- rHIEno로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에서 다양한 발달 단계(성충, 약충 및 유충)의 작은소참진드기의 Duration of feeding(흡혈에 소요되는 시간) 분석 결과이다. 성충과 유충에서 두 그룹 간에 유의한 차이(*; $P < 0.05$)가 관찰되었다.



- rHIEno로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에서 다양한 발달 단계(성충, 약충 및 유충)의 작은소참진드기의 부착률 분석 결과이다. 유충에서 두 그룹 간에 유의한 차이(***) ($P < 0.001$)가 관찰되었다.

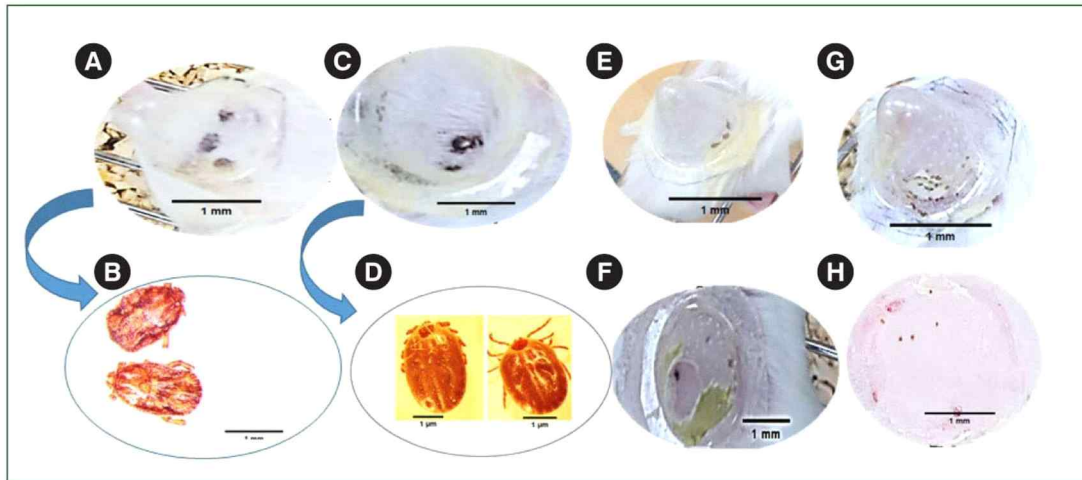


- rHIEno로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에서 약충 또는 유충 상태의 작은소참진드기의 감염(infestation) 후 3일째에 분석한 사망률 결과이다. 약충과 유충 모두 두 그룹 간에 유의한 차이(***) ($P < 0.001$)가 관찰되었다.



- rHIEno로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에서 다양한 발달 단계(성충,

약충 및 유충)의 작은소참진드기의 감염(Infestation) 후 3일째에 분석한 자발적인 탈락률 결과이다. 성충, 약충 및 유충 모두 두 그룹 간에 유의한 차이(***; P<0.001)가 관찰되었다.



- rHIEno로 면역된 마우스와 gene 10 단백질로 면역된 마우스(control)에 감염(Infestation)시킨 다양한 발달 단계의 작은소참진드기의 모습을 보여주는 것으로, (A)는 rHIEno로 면역된 마우스에 부착된 성충 진드기의 모습이고, (B)는 rHIEno로 면역된 마우스에 부착 후 6일째에 확인한 성충 진드기의 모습으로 낮은 충혈 수준이 확인되고 있다. (C)는 gene 10 단백질로 면역된 마우스에 부착된 성충 진드기의 모습이고, (D)는 gene 10 단백질로 면역된 마우스에 부착 후 7일째에 확인한 충혈된 성충 진드기의 모습이다. (E) 및 (G)는 각각 rHIEno로 면역된 마우스에 약충 진드기 또는 유충 진드기를 감염시킨 후 3일째의 모습으로 약충 및 유충 진드기가 부착하지 못한 모습을 보여주며, (F) 및 (H)는 gene 10 단백질로 면역된 마우스에 약충 진드기 또는 유충 진드기를 감염시킨 후 3일째의 모습으로 약충 및 유충 진드기가 적합하게 부착된 모습을 보여준다.

	Blood engorged weight (mg)	Egg mass weight (mg)
rHIEno로 면역화된 마우스에 감염시킨 성충	58.21±1.08	15±0.39
대조구 마우스에 감염시킨 성충	233±0.02	170±0.01

- 탈착 후의 약충 진드기를 대상으로 탈피 시간을 조사한 결과, 대조구 마우스에 감염시킨 약충 진드기는 19.6±1.5일 정도의 시간이 소요된 반면, rHIEno로 면역화된 마우스에 감염시킨 약충 진드기는 14±1.0일 정도의 시간이 확인되었다. 그러나, rHIEno로 면역화된 마우스에 감염시킨 약충 진드기는 상기 기일에 탈피가 제대로 이루어지지 않은 것으로 관찰되었으며, 이는 재조합 에놀라아제의 면역화에 따라 마우스(숙주)로부터 충분한 흡혈을 하지 못하여 영양학적 불균형이 초래되어 탈피 과정에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

라) 결론

- rHIEno로 면역화된 마우스에 감염시킨 약충 및 유충 에서 더 긴 pre-feeding period가 관찰
- rHIEno로 면역된 마우스에 감염시킨 유충 진드기는 대조군(100%)에 비해 유의하게 낮은 부착률(44.4%)을 보임
- rHIEno로 면역된 마우스에 진드기를 감염시킨 후 3일 후에 진드기의 자발적인 탈착률을 분석한 결과, 성충, 약충 및 유충 진드기의 자발적인 탈착률은 각각 66.7%, 100% 및 100%로 대조군(각각 33.3%, 40% 및 40%)에 비해 유의하게 높은 것으로 확인
- rHIEno를 이용한 숙주의 면역화가 진드기의 감염을 예방할 수 있는 효과를 나타냈음을 시사
- 에놀라아제 단백질이 진드기 감염을 위한 백신에 활용될 수 있는 충분한 항원성이 있음

마)요약

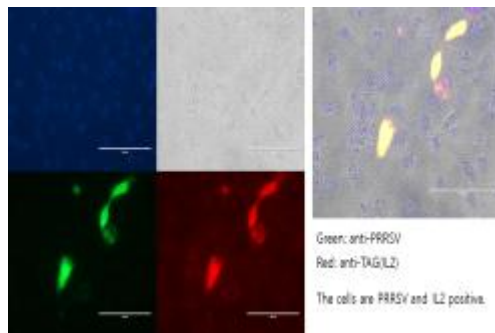
- 에놀라아제 단백질을 유효성분으로 포함하는 진드기 감염 예방용 백신 조성물 및 이의 용도에 관

한 것으로, 보다 상세하게는 본 보고서에 첨부된 아미노산 서열로 이루어진 에놀라아제 단백질을 유효성분으로 함유하는 진드기 감염 예방용 백신 조성물, 상기 백신 조성물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 진드기 감염을 예방하는 방법 및 상기 에놀라아제 단백질을 유효성분으로 함유하는 진드기 감염 예방용 백신의 효과가 있음을 제시하는 내용이다.

○ 3-1세부

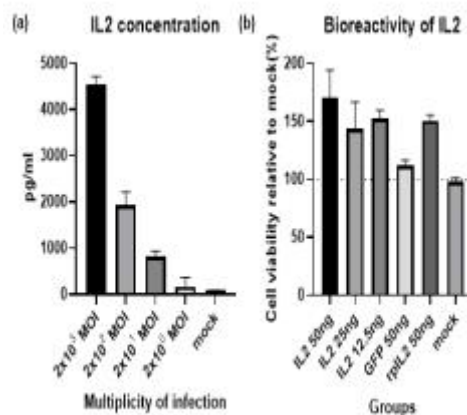
● 돼지 인터류킨2(IL2)를 분비하는 재조합 돼지 생식기 호흡기 바이러스 제작

- 지난 연구를 통해 돼지 인터류킨2와 돼지 생식기 호흡기 바이러스 백신을 함께 접종 하는 경우 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 감염되었을 때 폐 병변을 감소시켜 주는 것으로 밝혀졌으며 백신의 효능 증대로 이어질 수 있다는 사실을 확인함
- 이에 따라 돼지 생식기 호흡기 바이러스 백신 후보주(K418DM)의 유전자에 돼지 인터류킨2 유전자를 삽입하고, 백신 접종 시 돼지 인터류킨2 단백질을 발현하여 백신과 인터류킨2가 동시에 작용할 수 있도록 실험을 진행함



[그림 1. IL-2 유전자 삽입 후 형광현미경 분석 결과]

- 그 결과 돼지 인터류킨2를 발현하는 돼지 생식기 호흡기 바이러스 백신 후보주 (K418DM-IL2)를 제작할 수 있었으며 세포 내에서 돼지 인터류킨2 단백질을 발현하는 것을 확인할 수 있었음



[그림 1. IL-2 발현]

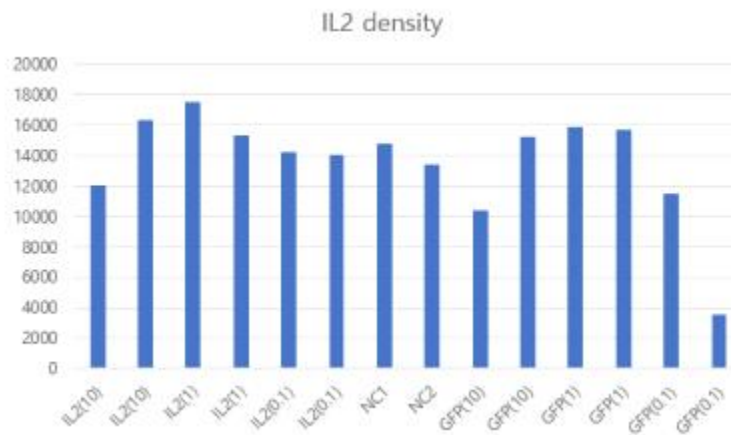
- 또한 돼지 인터류킨2 유전자가 정상적으로 발현되어 PBMC에 대해서 Bioreactivity를 갖는 것으로 확인 되었음

돼지를 이용한 in vivo 실험 결과, hypo-glycosylated chimeric diva virus가 임상증상, 체온, ADWG, viremia level 상에서 병원성이 없고 안전함을 확인함. Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus 접종군은 1:8 이상의 높은 중화항체가를 나타냈음.

돼지를 이용한 in vivo 실험 결과 peptide ELISA를 통한 항체 형성에 대한 평가는 O1m15 peptide antigen을 사용한 peptide ELISA 실험결과로 Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus는 Hypo-glycosylated chimeric virus에 비해 O1m15 antigen에 해당하는 항체를 항체 양성 비율 40:10로 형성함. 따라서, Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus는 DIVA를 형성하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 또한 확인 할 수 있음.

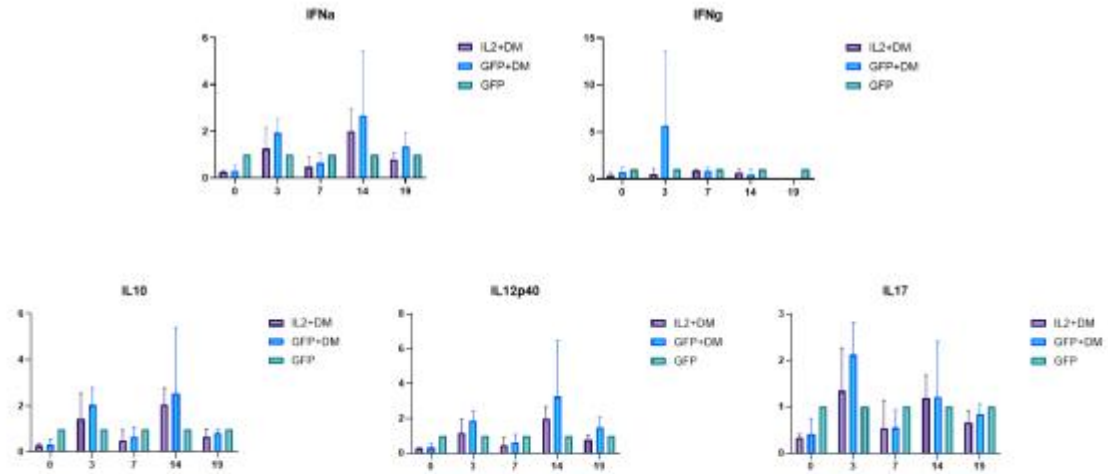
● 재조합 바이러스, 대식세포와 수지상세포를 이용한 폐 병변 재현

- 돼지 인터류킨2 유전자가 삽입된 PRRS 바이러스를 이용하여 실험실 수준의 효능 확인 시험을 진행하기 위하여 돼지의 PAM(porcine alveolar macrophage) 세포에 바이러스를 감염시킨 후 IL2의 발현을 확인함
- 그 결과 GFP(대조 단백질)군과 비교하여 돼지 인터류킨2 유전자가 삽입된 PRRS바이러스를 접종한 군에서 인터류킨2 단백질의 발현이 증가하는 양상을 확인하였음



[그림 1. PAM세포의 돼지 인터류킨2 단백질 발현 정도]

- PAM세포에서 발현된 돼지 인터류킨2가 PRRS의 폐병변을 유도하는지 확인하기 위하여 PAM세포를 상기의 돼지 인터류킨2 유전자가 삽입된 PRRS바이러스를 접종 한 후 PAM세포에서 유도되는 다양한 사이토카인의 변화를 qRT-PCR로 분석함

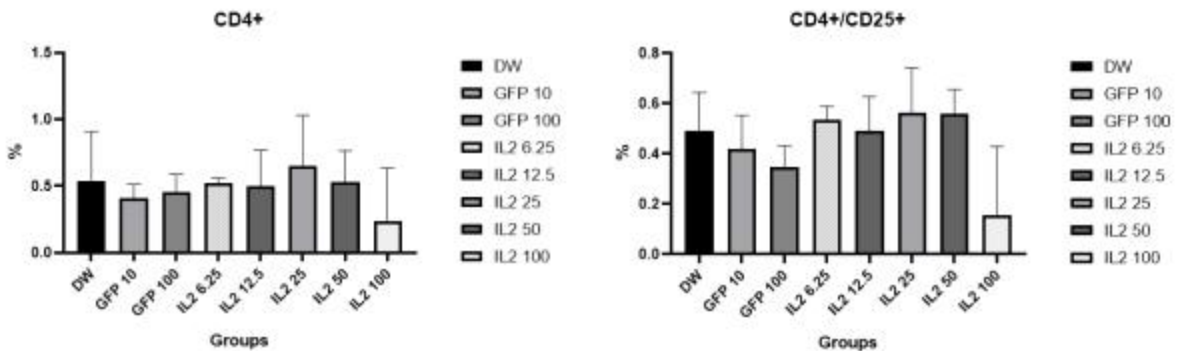


[그림 1. PAM세포에서 유도된 사이토카인의 양상]

- 인터페론 알파, 인터페론 감마, IL10, IL12, IL17 등의 사이토카인을 추적한 결과 돼지 인터류킨2 유전자를 삽입한 PRRS바이러스를 접종한 군이 다른 군에 비해 다소 경감된 염증성 사이토카인 분포를 보여주었음
- PAM세포를 이용한 돼지 폐 병변의 재현 시험 결과 돼지 인터류킨2 유전자는 염증성 사이토카인을 낮게 유지해 주는 것으로 폐병변을 경감 시켜줄 수 있다는 점을 확인할 수 있음

◎ 돼지 인터류킨2(IL2)를 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군의 폐 병변 발생 원리 이해

- 돼지 생식기 호흡기 증후군의 주요 증상인 폐 병변은 바이러스에 대한 면역 반응으로 인한 조직 손상이며 이는 바이러스가 조절 T 세포(regulatory t cel)의 역할을 교란하기 때문으로 알려짐
- 시험 결과 돼지 인터류킨2와 백신을 동시에 접종한 경우에서 염증 반응이 감소하는 것으로 밝혀졌으며 이는 인터류킨2가 바이러스에 의해서 교란된 조절 T 세포(regulatory t cell)의 역할을 보조하는 것으로 보임
- 이를 확인하기 위하여 4주령 돼지에서 추출한 말초 혈액 단핵세포 군에 돼지 인터류킨2 발현 물질을 첨가한 후 변화를 관찰하였으며, 그 결과 T 세포 군집과 조절 T세포 군집의 증가가 확인 됨



[그림 1. CD4+ T세포와 CD4+/CD25+ T세포(Treg) 세포 군집의 증가를 확인]

1. K418 재조합 바이러스를 제작한 후 기존에 미끼 항원 결정부위(decoy epitope)라고 알려진 부분을 double mutation(DM)을 통해 제거하여 K418DM을 제작.



2. K418DM을 접종한 마우스에서 22개의 단클론항체 확인.
 - hybridoma cell에서 얻어낸 단클론항체의 상대적인 양을 수치화 함.

K418DM					
< >	1	2	3	4	5
A	1.1031	0.2144	0.8432	1.1831	
B	0.3649	0.3031	0.9105		
C		0.1337	0.8854		
D	0.2263	0.2724	0.8866		
E		0.8407	0.2801		0.3233
F	0.1172	0.2523	0.1469		
G	0.2958	0.8817			
H	0.373	0.9746	0.1018		

3. K418DM의 주요 질병 방어 전략인 중화항체를 생성하는 여부를 판단하였으나 단클론항체에서의 중화 능력이 확인 되지 않음.
 - 중화시험 결과 22개의 단클론항체 후보중 0개의 후보에서 중화능력 확인.

K418DM	1	2	3	4	5
A	-	-	-	-	
B	-	-	-		
C		-	-		
D	-	-	-		
E		-	-		-
F	-	-	-		
G	-	-			
H	-	-	-		

● PRRSV 생독 및 사독 백신 개발

- 국내 양돈장에서 채취한 2종의 PRRSV 양성 샘플을 폐포대식세포에 접종하여 각각 PRRSV에 감염시킴
- 상기 폐포대식세포에서 분리한 PRRSV를 MARC-145 cell에 접종하여 계대를 80회 이상 반복하여 넘겨 바이러스를 약독화함

농장	개체번호	KU-N20	KU-N21	Ingelvac™	Primepac™
A 농장	1	3	3	2	2
	2	4	3	1	2
	3	4	3	3	3
	4	5	4	4	4
	5	4	4	2	4
B 농장	1	6	4	2	1
	2	3	1	0	0
	3	4	1	0	2
	4	5	3	3	3
	5	2	0	0	2

- 분리한 바이러스의 중화능을 현재 상용화된 PRRSV 백신과 비교했을 때 위 표와 같이 나타났으며, 상용화된 백신에 비해 높은 중화능을 나타내는 것이 확인됨.
- 이들 균주는 2022년 9월 15일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 하기와 같은 수탁번호를 부여받음.
 - PRRSV KU-N20 : 수탁번호 KCTC19029P
 - PRRSV KU-N21 : 수탁번호 KCTC19030P
- 최종적으로 새로운 PRRSV 생독 및 사독 백신 개발에 성공했으며, 특히 출원을 완료함.
 - ① Hypo-glycosylated chimeric DIVA(Differential infection vaccine animals) virus 제작
 - a. Neutralizing epitope을 노출시켜서 중화항체 생산을 유도하기 위해 chimeric virus의 ORF5에 N44S deglycosylation mutation을 부여함
 - b. Wild type virus와 비교하여 항체 생산의 감소를 유도하기 위해 G16S, Q17R, N20S point mutation을 부여함



Figure 1 Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus candidates의 *in silico* design

- c. Hypo-glycosylated chimeric DIVA (Differential infection vaccine animals) virus
 - 가) G46A mutation을 부여하여 G16S mutation을 유발, A50G mutation을 부여하여 Q17R mutation을 유발, A59G mutation을 부여하여 N20S mutation을 유발함.
 - 나) Rescued virus의 ORF5 및 ORF7 sequence 분석 결과 P12(#18-3)까지 mutation 없으며, 역가 측정 결과 6.13 logTCID를 나타내어 최종 stock으로 결정함
- ② Rescued virus 특성 분석

a. *In vitro* stability test

가) Hypo-glycosylated chimeric virus 최종 stock (#18-3-P12)에 대해 추가 계대를 진행하여 *in vitro* stability를 평가함

나) 5회 추가 계대 후 #18-3 P17의 ORF5 및 ORF7 sequence 분석 결과 P17까지 mutation 없으며 역가 측정 결과 6.63 logTCID를 나타내어 *in vitro* stability를 가짐을 확인함

③ Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus 효능 평가

a. 실험 목표

가) vaccine candidate의 *in vivo* 병원성 평가 (evaluation of virulence)

나) 과용량 (10 dose) 안전성 시험 (overdose test)

다) Back-passage를 통한 안전성 시험

라) vaccine candidate의 면역원성 평가 (immunogenicity test)

b. 실험군

군	접종액 (0 DPI)	두수
음성대조군	None	3두
백신군	Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus (10 ^{5.5} TCID ₅₀ /1 mL/dose, IM)	5두
Total		8두

c. 실험 일정: 7주령 자돈에 백신 후보주 접종 39일 후 안락사 및 부검

d. 관찰 항목: 임상증상, 체온, 체중, viremia level, ELISA 항체가, 중화항체가, tissue viral load, 폐 조직병변 등

e. 실험 결과

가) 임상증상 점수 (활동성, 우울함/호흡기 증상/외모 평가)

그룹	자돈 NO.	DPI							
		0	1	3	7	14	21	28	35
음성대조군	1	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	2	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
백신군	4	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	5	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	6	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	7	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3
	8	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3	0/0/3

* 활동성, 우울함 정도는 두 점수를 합하여 최대 6점을 부여

* 임상증상 평가는 아래 표를 따름

<임상증상 평가 기준표>

활동성	0	정상
	1	활동성 약간 감소, 움직이려 하지 않음/반응 과장
	2	이동량 감소, 기민함 감소, 활달하지 않거나 공격적임
	3	서있을 수 없거나 서있지 않음, 체온 38°C 미만(저체온)
우울함	0	활달하고 기민함
	1	느리게 먹고, 느리게 움직임
	2	잘 먹거나 움직이지 않음
	3	무기력함, 자극이 있을 때만 반응함
호흡기 증상	0	정상
	1	스트레스 상태에서 약한 호흡곤란 및/또는 빈호흡
	2	설 때 약한 호흡곤란 및/또는 빈호흡
	3	스트레스 상태에서 중등도의 호흡곤란 및/또는 빈호흡
	4	설 때 중등도의 호흡곤란 및/또는 빈호흡
	5	스트레스 상태에서 심한 호흡곤란 및/또는 빈호흡
	6	설 때 심한 호흡곤란 및 /또는 빈호흡
외모	1	수척함
	2	마름
	3	이상적임
평가	4	살찐
	5	매우 살찐

나) 체온 (°C)

그룹	자돈NO.	DPI							
		0	1	3	7	14	21	28	35
음성대조군	1	39.5	39.0	39.0	39.1	38.9	39.2	39.1	39.2
	2	39.3	38.9	38.8	39.0	39.2	38.8	38.8	39.3
	3	39.2	38.9	39.0	38.8	39.1	39.0	38.9	38.7
	평균	39.3	38.9	38.9	38.9	39.1	39.0	38.9	39.0
	표준편차	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3
백신군	4	39.6	39.1	38.8	39.4	38.9	38.8	38.8	39.3
	5	39.1	38.8	38.8	39.2	39.2	39.0	38.7	39.1
	6	39.3	38.9	39.0	39.3	39.1	39.1	38.7	38.9
	7	39.2	39.0	39.2	39.2	39.1	39.1	39.0	38.9
	8	39.2	39.1	39.3	39.1	39.3	38.9	39.2	39.0
	평균	39.3	39.0	39.0	39.2	39.1	39.0	38.9	39.0
	표준편차	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2

다) Viremia level (logTCID equivalent)

그룹	자돈NO.	DPI							
		0	1	3	7	14	21	28	35
음성대조군	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	평균	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	표준편차	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
백신군	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

평균	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
표준편차	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

라) ELISA 항체가 (S/P values)

그룹	자돈NO.	DPI					
		0	7	14	21	28	35
음성대조군	1	0.00	-0.01	-0.01	-0.02	0.17	0.05
	2	-0.09	0.03	-0.01	-0.04	-0.01	-0.04
	3	-0.04	-0.04	-0.01	-0.05	-0.06	-0.02
	평균	-0.05	0.00	-0.01	-0.03	0.01	0.01
	표준편차	0.04	0.03	0.00	0.02	0.11	0.05
백신군	4	0.04	0.03	0.00	0.02	0.11	0.05
	5	-0.09	-0.04	0.01	0.09	0.45	0.70
	6	-0.08	-0.04	0.23	0.36	1.34	2.01
	7	-0.01	-0.01	0.20	0.04	0.27	0.79
	8	-0.02	0.00	0.34	0.89	1.37	2.02
	평균	-0.05	-0.02	0.19	0.35	0.86	1.38
	표준편차	0.04	0.02	0.14	0.39	0.58	0.73

마) Peptide ELISA 항체가, O1m15 peptide coating (S/P values)

그룹	자돈NO.	DPI					
		0	7	14	21	28	35
음성대조군	1	0.00	-0.01	-0.01	-0.02	0.17	0.05
	2	-0.09	0.03	-0.01	-0.04	-0.01	-0.04
	3	-0.04	-0.04	-0.01	-0.05	-0.06	-0.02
	평균	-0.05	0.00	-0.01	-0.03	0.01	0.01
	표준편차	0.04	0.03	0.00	0.02	0.11	0.05
백신군	4	0.04	0.03	0.00	0.98	0.20	0.05
	5	-0.09	-0.04	0.01	-0.14	-0.19	-0.20
	6	-0.08	-0.04	0.4	-0.09	-0.10	-0.25
	7	-0.01	-0.01	0.20	-0.10	0.20	-0.07
	8	-0.02	0.00	0.34	1.13	2.33	1.60
	평균	-0.05	-0.02	0.19	0.35	0.49	0.23
	표준편차	0.04	0.02	0.14	0.64	1.04	0.77

바) 중화항체가 (\log_2)

그룹	자돈NO.	DPI					
		0	7	14	21	28	35
음성대조군	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	평균	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	표준편차	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
백신군	4	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	4.00
	5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
	7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00

8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
평균	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.00
표준편차	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70

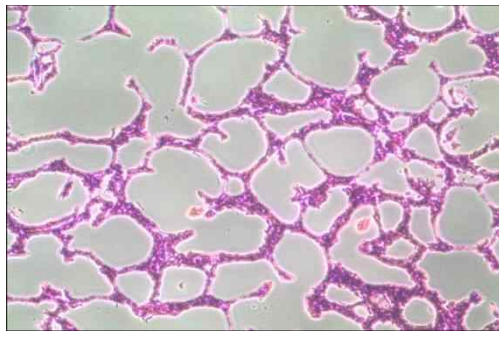
사) 체중 (kg), tissue viral load (logTCID equivalent), 거대폐병변 점수 (100점), 미세폐병변 점수 (4점)

그룹	자돈NO.	체중 (kg)		tissue viral load (logTCID equivalent)			폐병변 점수
		DPI 0	DPI 35	Lung	TBLN	거대 (100)	미세 (4)
음성대조군	1	9.9	27.5	0	0	0	0.8
	2	8.4	26.8	0	0	0	0.65
	3	9.4	27.1	0	0	0	0.9
	평균	9.2	27.1	0	0	0	0.78
	표준편차	0.7	0.3	0	0	0	0.1
	4	7.2	24.6	0	0	0	0.75
백신군	5	9.6	28.8	0	0	0	0.8
	6	10.9	27.6	0	0	0	0.9
	7	9.0	26.9	0	0	0	0.95
	8	10.0	27.1	0	0	0	1.1
	평균	9.3	27	0	0	0	0.9
	표준편차	1.3	1.5	0	0	0	0.1

아) 미세폐병변 사진 (representative figures)

그룹

음성대조군

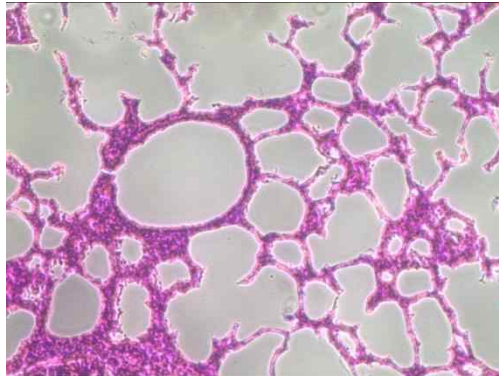


No.1, slide 5, score 1, 100x

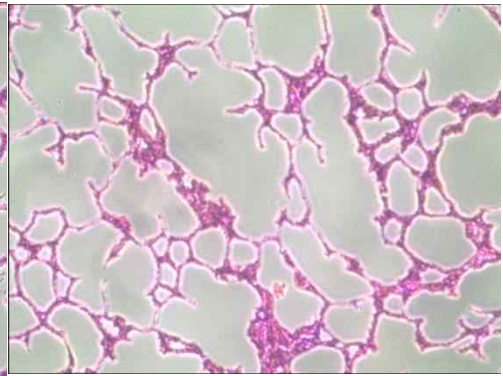


No.3, slide 2, score 1, 100x

백신군

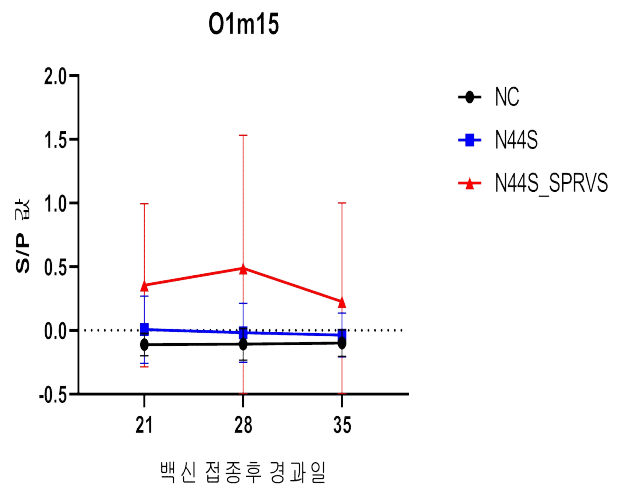
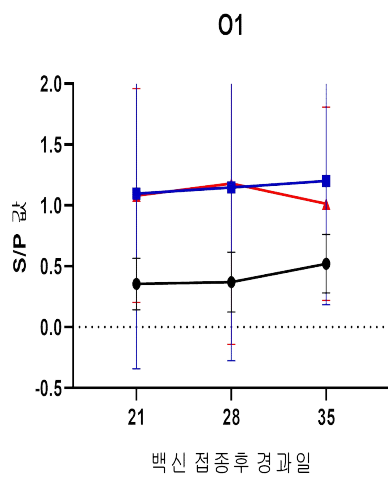


No.6, slide 3, score 1, 100x



No.8, slide 8, score 0, 100x

자) Peptide ELISA (S/P ratio)



○ 3-2세부

● 1년차

1) 가금 세균성 감염병 시료에 대한 미생물학적 특성조사

● 국내 야외 분리주 *Salmonella Gallinarum* 균주 확보 및 항생제 감수성 검사

국내에서 분리된 병원성 *Salmonella Gallinarum* 야외주들의 항생제 내성 패턴을 파악하기 위하여 본 연구팀에서 분리한 7종의 야외주에 대해 실시한 항생제 감수성 검사의 결과는 아래 <그림>와 같음.

	CIP	IMI	AMP	TET	GEN	STR	NAL	FOX	COL	TAZ	FOT	AXO	CHL	AZI	AMI	SXT
SG1	R	S	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
SG2	R	S	S	S	S	R	R	I	R	S	I	S	S	S	S	S
SG3	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
SG4	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
SG5	R	S	S	I	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
SG6	I	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SG7	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
SG9R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Susceptible, I: Intermediate, R: Resistant

<국내 *Salmonella gallinarum* 야외 분리주 7종의 항생제 감수성 검사 결과>

2) 가금 세균성 감염병 시료에 대한 유전자원 확보 및 분석

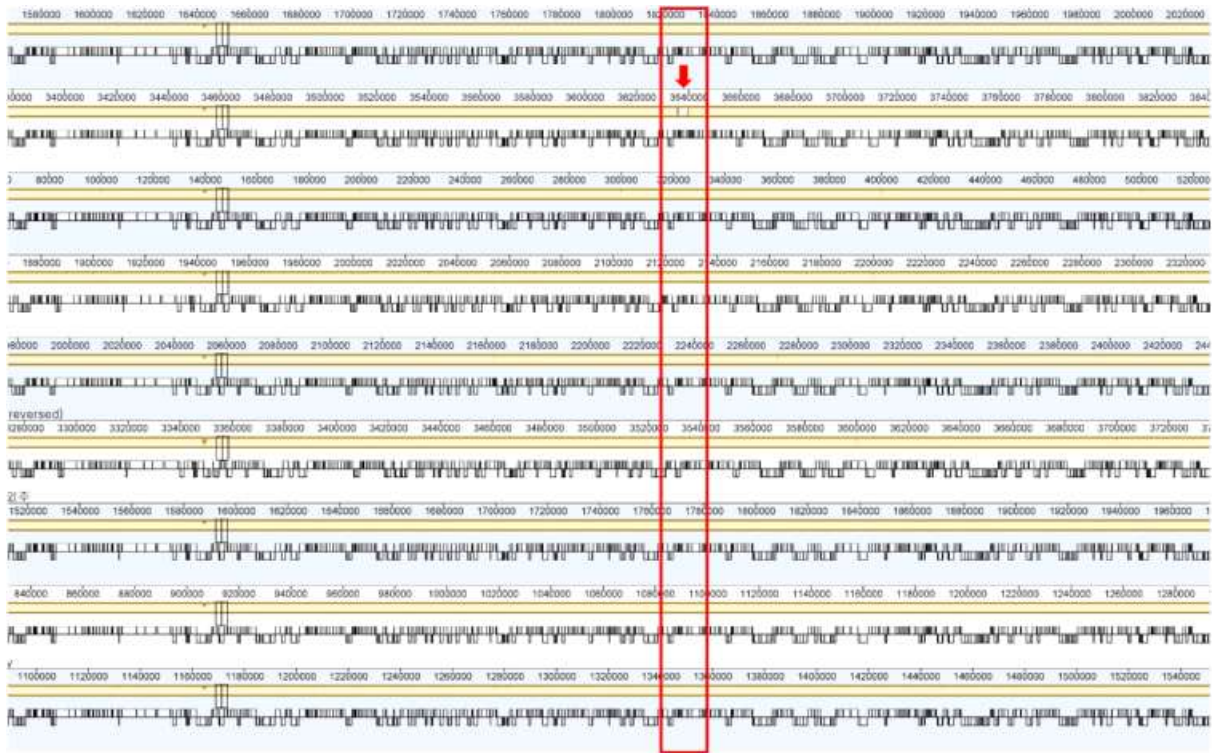
- 국내에서 분리된 *Salmonella Gallinarum* 야외주와 가금 티푸스 예방을 위해 사용하는 *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주의 유전적 특성 분석을 위하여 총 8개 *Salmonella gallinarum* 세균의 전장 유전체를 확보하였음.

- Illumina사의 Teraseq을 이용하여 위 8개의 *Salmonella Gallinarum* 균주의 DNA에 대한 short read based whole genome sequencing을 진행하였음.

- MinION sequencing으로 얻어진 raw data를 base calling하여 raw fastq read들로 변환한 뒤, 100x coverage 수준에서 random sampling을 진행하였음. 5회 반복시행한 read set을 두 가지의 genome assembler를 이용하여 long read sequencing data와 short read sequencing data를 hybrid assembly하여 조립함.

● 국내 야외분리주와 백신주의 전장 유전체 비교 분석 및 *Salmonella Gallinarum* 백신주 감별법 개발

- *Salmonella Gallinarum* 9R 백신주에서만 나타나는 특정 유전자의 일부 중복에 의한 염기서열 차이를 확인한 결과는 아래 <그림>와 같음.

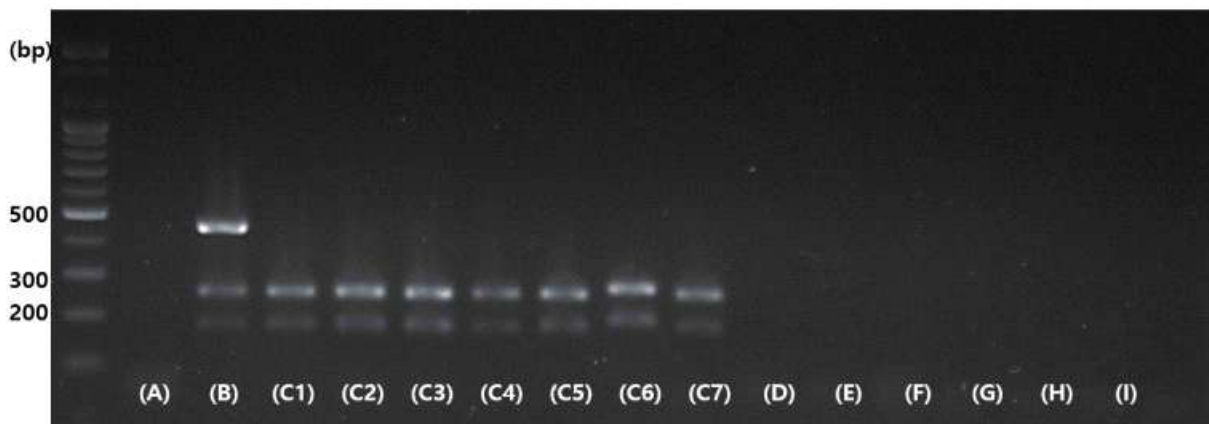


<Mauve alignment를 이용한 7개의 *Salmonella* Gallinarum 야외주와 1개 백신주 전장 유전체 비교 분석>

- 염기서열 차이를 보이는 부분에서 Primer3 program을 이용하여 primer를 제작함.

● 새로운 SG 야외주/SG9R 백신주 감별 primer의 성능 확인

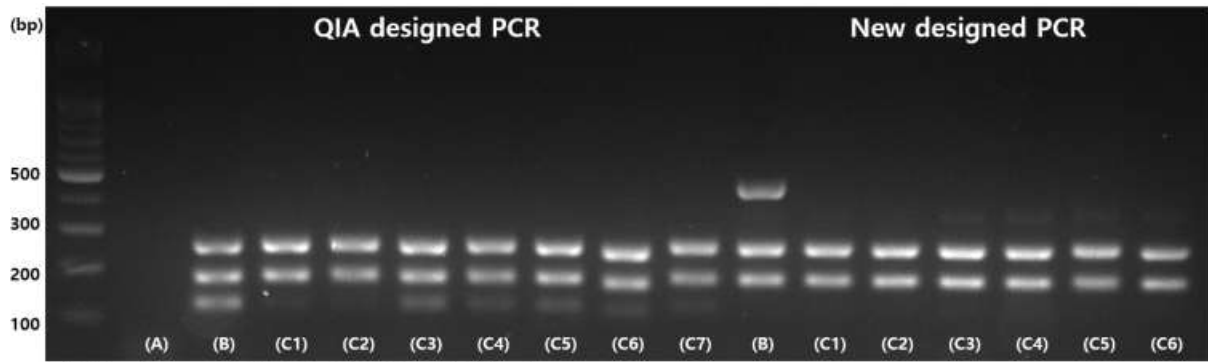
- 기존의 검역검사본부(SG-L/R primer, SGP-L/R, SG9R-L/R primer) triplex SG/SP/SG9R 감별 PCR법에서 백신 감별 primer인 SG9R-L/R primer set을 새로이 개발한 백신주 특이 primer set으로 대체하여 성능을 확인함.



(A)-Negative control, (B)-SG9R, (C1~7)-SG field strains, (D)-*S. Virchow*, (E)-*S. Enteritidis*, (F)-*S. Montevideo*, (G)-*S. Typhimurium*, (H)-*S. Agona*, (I)-*E. coli*

<새롭게 디자인한 primer의 PCR 반응을 통한 민감도와 특이도 확인 결과>

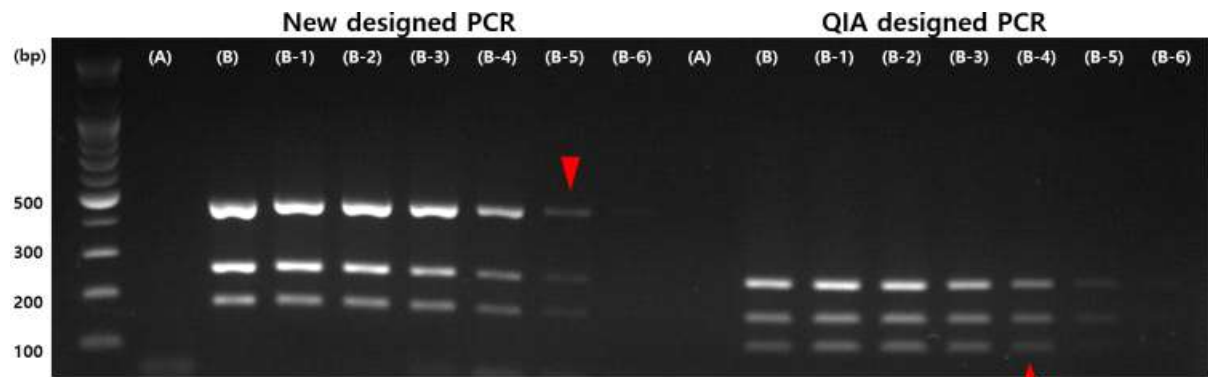
-새롭게 디자인한 백신주 특이 primer는 SG9R 백신주만을 특이적으로 진단할 수 있으며 다른 혈청형의 살모넬라나 대장균과 같은 이종 세균에서는 음성 반응을 나타내었음



(A)-Negative control, (B)-SG9R, (C1~7)-SG field strains

<기존 검역검사본부 Primer와 새로운 Primer의 특이도 비교 결과>

- 또한 새로운 백신주 특이 primer는 기존의 검역검사본부의 triplex PCR 방법이 상대적으로 낮은 annealing temperature에서 보이는 결과보다 정교한 백신주 진단 결과를 나타내었음



(A)-Negative control, (B)-SG9R(2.2×10^9 cfu/ml, DNA Concentration: 61ng/ul), (B-1~6): Descending ten-fold serial dilution of SG9R(B).

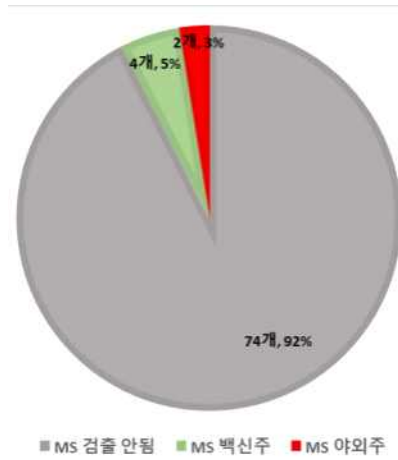
<세균 CFU에 따른 DNA 농도 대비 PCR 감지능 한계치의 비교 결과>

- 새로운 백신주 특이 primer는 기존의 방법 대비 10배 더 낮은 농도의 SG DNA를 증폭시켜 양성으로 진단할 수 있음을 PCR 반응 결과 확인하였음

● 2년차

1) 임상증상을 보이는 닭에서의 MS/MG 검출율

- 본 연구팀은 2021년에 총 80개의 샘플을 채취하였으며 이에 대해 MS specific PCR과 DIVA PCR을 진행하였음. 총 80개의 샘플에서 MS 백신주와 MS 야외주의 검출율은 <그림 >과 같음. MG specific PCR과 DIVA PCR도 80개의 샘플에서 진행하였으나

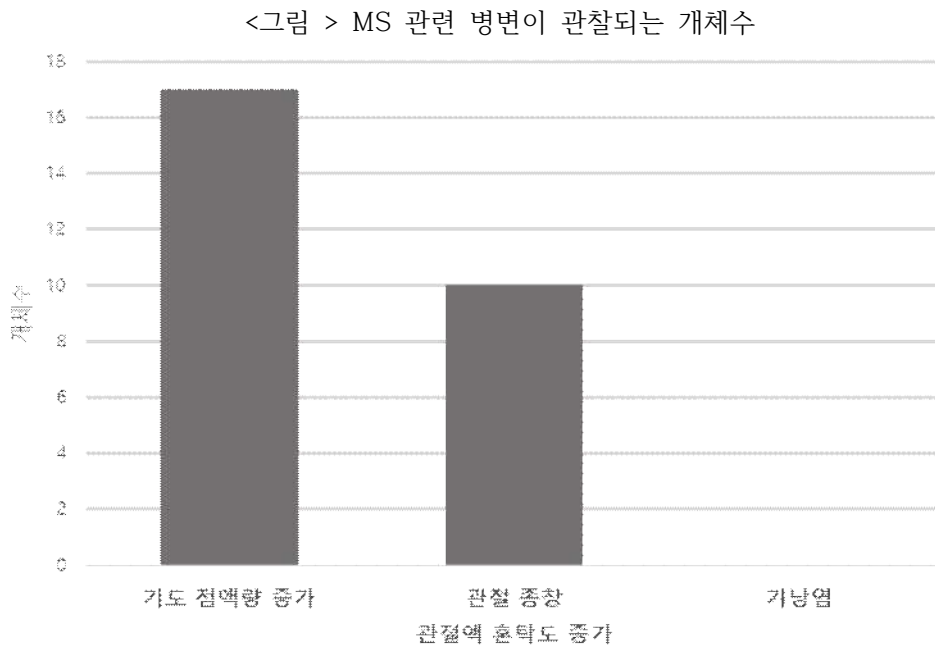


<그림 > 닭 샘플에서 MS 백신주와 MS 야외주의 검출율

- 검출한 2개의 야외주에 대해서 순수분리 배양을 시도하였으나 해당 균주들의 느린 Growth rate와 오염이 쉽게 발생하는 Modified Frey Broth의 특징 때문에 순수분리 배양은 아직 진행 중임.

2) 병변들의 발생과 MS 검출율의 연관성

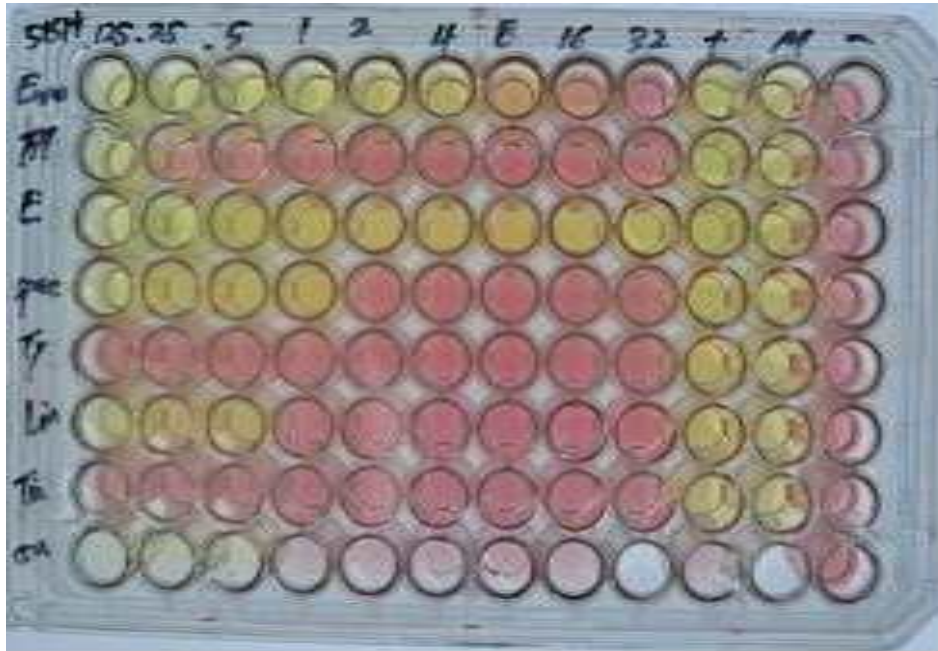
- 본 연구팀은 기도, air sac, 관절액을 관찰하였으며 80개의 샘플에서 각 병변이 나타나는 발생한 개체수는 <그림 >와 같음



- 기도 점액량 증가가 관찰된 개체는 17마리로 가장 많이 발생하였으며 관절액의 혼탁도 증가를 보이는 개체는 10마리가 관찰되었음. 그러나 기낭염을 보이는 개체는 관찰되지 않음.
- 병변이 관찰된 개체는 MS 야외주가 검출된 개체보다 더 많은 것으로 나타남. 이를 통해 본 과제에서 확인한 병변은 MS에 한정되어 발견되는 병변이 아니기에 해당 병변만을 가지고 MS 야외주의 존재 여부를 확인하는 것은 불확실하다고 판단됨.

3) 한국에서 순수분리한 MS의 항생제 감수성 검사 결과

- 본 연구팀이 보유하고 있던 기 한국 순수분리주 G3, 18DW,BS4S2, A4, 51SH에 대해서 항생제 감수성 검사를 실시한 예시와 결과는 각각 <그림>, <표 >와 같음.



<그림 > MS strain=51SH에서 실시한 항생제 감수성 검사 결과

<표 > 기 한국 MS 순수분리주에 대해서 진행한 항생제 감수성 검사의 MIC 결과

Isolate ID	MIC (ng/ul)						
	En	Tm	E	Sp	Ty	Li	Ti
G3	32	>32	32	1	2	0.25	<0.125
13DW	32	0.25	>32	2	<0.125	1	<0.125
BS4S2	16	<0.125	>32	1	<0.125	1	<0.125
A4	16	16	8	2	1	0.25	<0.125
51SH	32	0.25	>32	2	<0.125	1	<0.125

En=Enrofloxacin, Tm=Tilmicosin, E=Erythromycin, Sp=Spectinomycin, Ty=Tylosin, Li=Lincomycin, Ti=Tiamulin

빨간색 MIC 값 = Elevated MIC

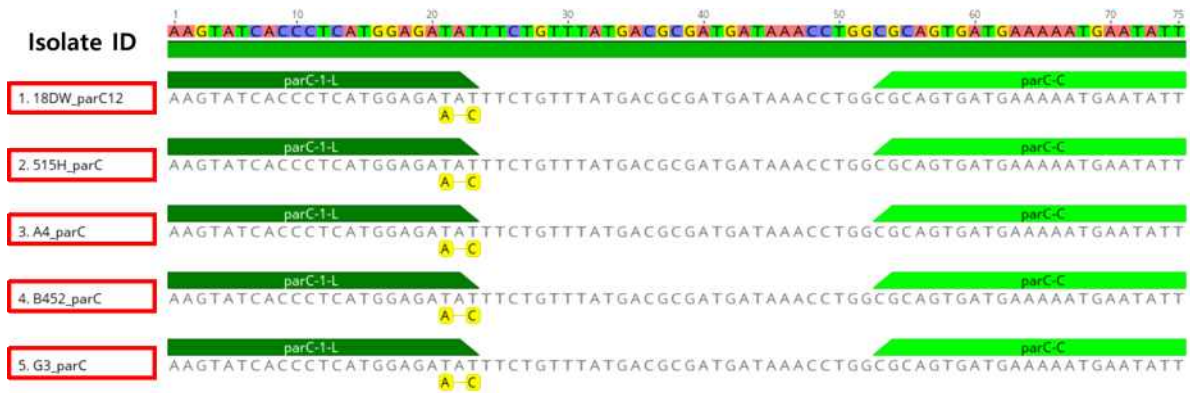
파란색 MIC 값 = Low MIC

회색 MIC 값 = Not Determined

4) 항생제 내성 진단 유전자 PCR 검증

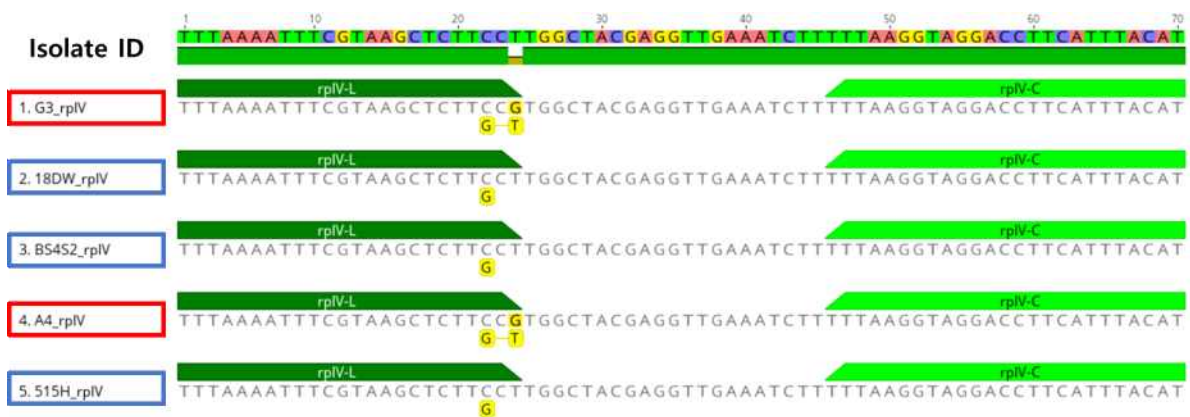
- Bekó et al.에서의 Fluoroquinolone계열, Macrolide계열, Lincosamide계열 항생제에 대한 내성을 검출하는 PCR을 기 한국 순수분리주에 적용하였음. 항생제 내성 진단 PCR과 *in-vitro* 항생제 감수성 검사 결과는 모두 일치하는 것으로 나타남.

- *in-silico*에서 본 실험실이 보유하고 있던 기 한국 순수분리주 5개의 전장유전체에 PCR primer를 적용한 결과는 <그림 >, <그림 >, <그림 >와 같음.



Fluoroquinolone 계열 항생제에 내성이면 Isolate ID를 빨간색으로 표시함
 Fluoroquinolone 계열 항생제에 감수성이면 Isolate ID를 파란색으로 표시함

<그림 >. *in-silico*상의 Fluoroquinolone 계열 항생제 내성 진단 PCR 결과



Macrolide 계열 항생제에 내성이면 Isolate ID를 빨간색으로 표시함
 Macrolide 계열 항생제에 감수성이면 Isolate ID를 파란색으로 표시함

<그림 >. *in-silico*상의 Macrolide 계열 항생제 내성 진단 PCR 결과



Lincosamide 계열 항생제에 내성이면 Isolate ID를 빨간색으로 표시함
 Lincosamide 계열 항생제에 감수성이면 Isolate ID를 파란색으로 표시함

<그림 >. *in-silico*상의 Lincosamide 계열 항생제 내성 진단 PCR 결과

5) 항생제 내성 진단 유전자 후보군 확인

- Bekó et al.의 93개의 MS 균주에 대한 sequence read data를 NCBI Sequence Reads Archive에서 확보함.
- 확보한 sequence read들을 MS WVU-1853을 reference로 삼아 mapping을 진행하여 93개의 균주에 대한 Draft Genome를 제작함.
- Tetracycline에 대해서 증가한 MIC가 관찰되는 MS가 보유한 유전자들 중 Tetracycline에 대해서 낮은 MIC가 관찰되는 MS에는 없는 유전자들을 추출한 결과는 <표 >와 같음.

<표 >. Tetracycline 계열 항생제에 내성인 MS가 갖는 특이적 유전자

Gene	Annotation
group_24	hypothetical protein
group_88	hypothetical protein
group_37	hypothetical protein
group_110	hypothetical protein
group_29	hypothetical protein
group_93	hypothetical protein
asnA_1	Aspartate—ammonia ligase
group_102	hypothetical protein
group_49	hypothetical protein
group_83	hypothetical protein
tsf_2	Elongation factor Ts
group_10	hypothetical protein

- Tetracycline 계열 항생제에 내성인 MS가 갖는 특이적 유전자들 중 Annotation이 가능한 유전자가 2개 존재했으나 2개의 유전자 모두 Tetracycline의 작용 범위와 다른 기능을 지니고 있어서 해당 유전자에 의해 Tetracycline 계열 항생제의 내성이 발현된다고 보기는 어려움.
- Tiamulin에 대해서 증가한 MIC가 관찰되는 MS가 보유한 유전자들 중 Tiamulin에 대해서 낮은 MIC가 관찰되는 MS에는 없는 유전자들의 추출을 시도하였으나 조건에 알맞은 유전자는 존재하지 않음을 확인함.

● 3년차

1) 기확보한 MS의 Growth Rate

- 본 연구팀은 기확보한 5개의 MS 균주에 대해서 접종 후 Exponential Phase까지 도달하는 시간 측정 실험을 진행하였음. 5개의 MS 균주들의 Exponential Phase 도달 시간은 <표 >와 같음.

<표 > 기확보한 균주 접종액의 색 변화가 관찰되기까지 경과되는 시간

Strain Name	Time until Color Change was observed
18DW3	71hr 45min
51SH4	54hr 10min
A4	92hr 2min
G3	27hr
BS4S2	78hr 12min

- MS는 배양시간이 길기에 계대배양 시간을 단축시키기 위해서 빠른 성장을 보이는 균주 선택이 필요함. <표 1>에서 MS G3 균주를 접종한 접종액이 색 변화가 관찰되기까지 가장 짧은 시간이 걸린 것으로 나타남. 따라서 Oxytetracycline과 Tiamulin의 내성 발현 실험에 사용할 균주로 MS G3 균주를 선정함.

◎ MS G3 균주의 Oxytetracycline과 Tiamulin의 항생제 감수성 검사

- MS G3에 대해서 Oxytetracycline과 Tiamulin에 대해서 항생제 감수성 검사를 실시한 결과는 <표 2>와 같음.

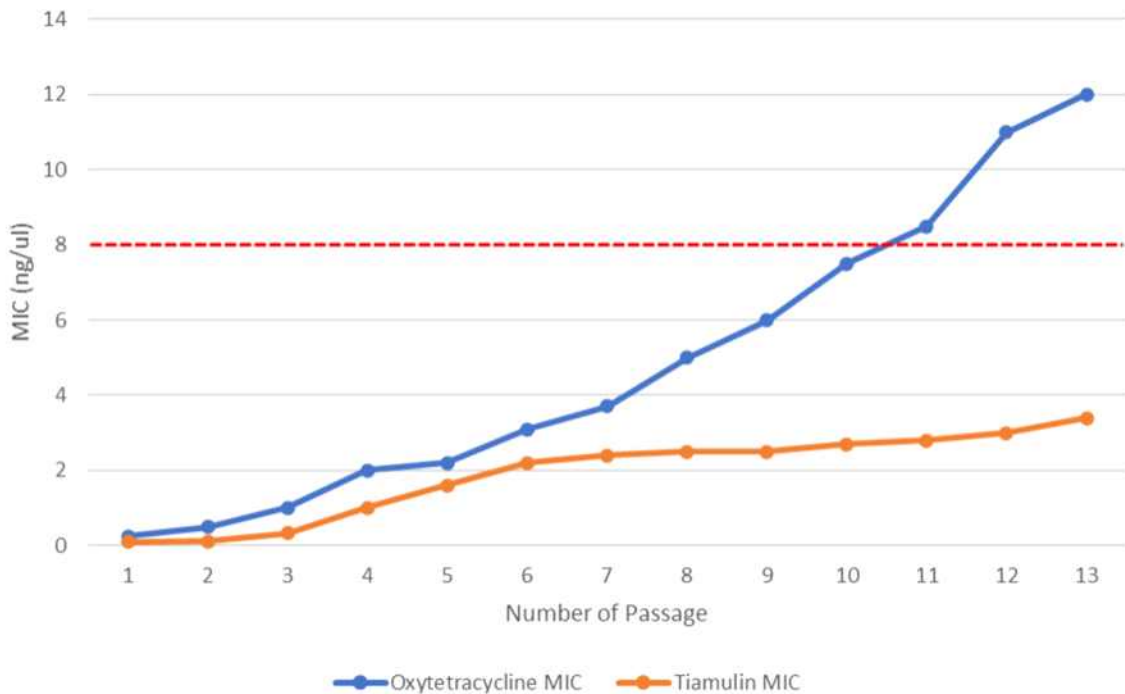
<표 2> Oxytetracycline과 Tiamulin에 대한 MS G3 균주의 MIC

Strain Name	MIC (ng/ul)	
	Oxytetracycline (MIC breakpoint: 8ng/ul)	Tiamulin (MIC breakpoint: 8ng/ul)
G3	0.5	0.125

- MS G3 균주의 Oxytetracycline에 대한 MIC는 0.5ng/ul, Tiamulin에 대한 MIC는 0.125ng/ul로 나타남. Hannan et. al.에서 제시된 MS의 Oxytetracycline MIC breakpoint와 Tiamulin MIC breakpoint는 8ng/ul로 계대배양 전의 MS G3 균주는 Oxytetracycline과 Tiamulin에 감수성이 있음을 확인함.

● MS G3 균주의 계대배양을 통한 Oxytetracycline과 Tiamulin에 대한 내성 발현

- 항생제 농도를 높이는 방향으로 MS G3 균주를 계대배양한 후 각 항생제 농도에서 성장이 관찰된 균주들의 MIC 측정 결과는 아래 <그림 2>과 같음.



<그림 2> 계대배양 균주들의 Oxytetracycline과 Tiamulin에 대한 MIC

빨간색 점선은 두 항생제의 MIC breakpoint를 나타냄

- <그림 2>에서 13번째 계대배양주의 Oxytetracycline에 대한 MIC는 12ng/ul, Tiamulin에 대한 MIC는 3.4ng/ul로 나타남. Oxytetracycline에 대해서 계대배양을 진행한 균주의 MIC는 Hannan et. al.에서 제시된 MIC breakpoint보다 이상임으로 해당 균주는 Oxytetracycline에 내성임. 그러나 Tiamulin에 대해서 계대배양을 진행한 균주의 MIC는 Hannan et. al.에서 제시된 MIC breakpoint보다 낮기에 해당 균주는 Tiamulin에 대해서 내성이 아니지만 MIC가 계대배양 전보다 현저히 증가했기에 실험에 사용함.

● Oxytetracycline과 Tiamulin 내성 MS의 유전체 분석

- Pseudogene부분을 제외한 Oxytetracycline과 Tiamulin 내성 MS의 유전체를 비교 분석한 결과는 각각 <표 3>, <표 4>와 같음.

<표 3> Oxytetracycline 내성 MS의 유전체 비교 분석 결과

Mutation Type	Reference Nucleotide	Changed Nucleotide	Product of Changed Region
ins	G	GATAT	Non Coding Region
snp	T	C	AAA family ATPase
snp	C	T	ABC transporter ATP-binding protein/permease
snp	G	T	magnesium transporter
mnp	GA	TC	Non Coding Region
snp	A	T	Non Coding Region
snp	A	G	ABC transporter permease
snp	C	T	ABC transporter permease
snp	G	A	ABC transporter permease
snp	T	C	Non Coding Region
snp	T	A	Non Coding Region
snp	C	T	Non Coding Region
snp	C	A	Non Coding Region
snp	C	T	Non Coding Region

ins-insertion mutation, snp-single nucleotide polymorphism, mnp-multiple nucleotide polymorphism

- Oxytetracycline 내성 발현 MS에서 발생한 Mutation 중 알려진 Oxytetracycline의 내성 기전에 관여하는 유전자에 발생한 Mutation은 발견되지 않았음.

<표 4> Tiamulin 내성 MS의 유전체 비교 분석 결과

Mutation Type	Reference Nucleotide	Changed Nucleotide	Product of Changed Region
snp	G	A	50S ribosomal protein L3
snp	G	A	50S ribosomal protein L2
snp	G	T	magnesium transporter
mnp	GA	TC	Non Coding Region
snp	A	T	Non Coding Region
snp	A	G	ABC transporter permease
snp	G	A	ABC transporter permease
snp	T	C	Non Coding Region
snp	T	A	Non Coding Region
snp	C	T	Non Coding Region
snp	C	A	Non Coding Region
snp	C	T	Non Coding Region

snp-single nucleotide polymorphism, mnp-multiple nucleotide polymorphism

- Tiamulin 내성 발현 MS에서 발생한 Mutation 중 Tiamulin의 내성 기전에 관여하는 50S ribosomal protein L3와 50S ribosomal protein L2에 Mutation이 관찰됨.
- Tiamulin 내성 발현 MS에서 발생한 Mutation이 포함된 유전자는 NCBI database에서 발견되지 않음. 이는 현재까지 Tiamulin에 내성을 보이는 MS가 발견되지 않았기에 본 연구에서 발생한 Mutation이 지금까지 보고되지 않은 Tiamulin에 내성을 야기하는 증거로 고려될 수 있음.

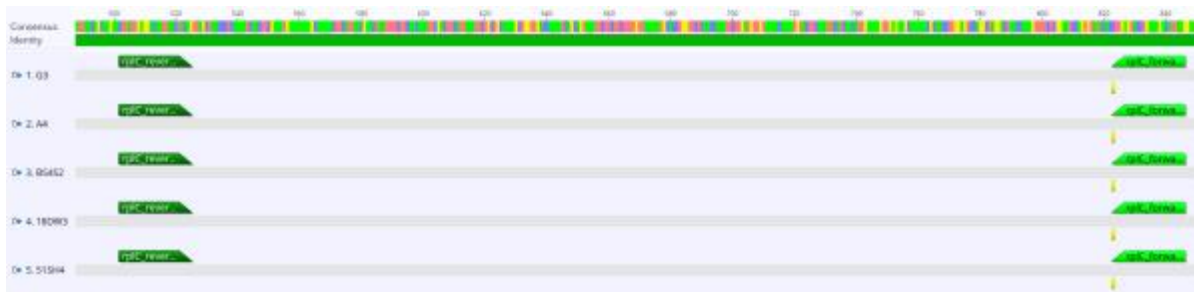
◎ Tiamulin에 대한 항생제 내성 진단용 PCR 개발 및 적용

- 본 연구팀에서 개발한 Tiamulin에 대한 항생제 내성 진단용 PCR primer의 정보는 <표 5>와 같음.

<표 5> Tiamulin 내성 진단용 PCR primer

Target Gene	Primers	Annealing Temp (°C)
50S ribosomal protein L3	rplC_F CAATTAGACAAACTGGATCACTTA	53
	rplC_R CAATAAGTGGTCTTAATTCATCTG	
50S ribosomal protein L2	rplB_F CACTTCCGCTATCAAATATTCCTA	53
	rplB_R CTAAGTGGACGAATACCTC	

- NCBI database와 본 연구팀이 기보유한 MS의 전장유전체를 이용하여 *in-silico* 상에서 Tiamulin 내성 진단용 PCR을 적용한 결과는 아래 <그림 3>, <그림 4>과 같음.



<그림 3> *in-silico* 상 50S ribosomal protein L3 내성 진단용 PCR 적용



<그림 4> *in-silico* 상 50S ribosomal protein L2 내성 진단용 PCR 적용

- <그림 3>과 <그림 4>와 같이 현재까지 보고된 Tiamulin 감수성 MS들은 본 연구팀에서 발견한 SNP를 보유하지 않은 것을 확인함.

● 4년차

1) 가금 도체 유래 *Salmonella* 분리

- 본 연구팀은 총 100마리의 가금 도체에서 *Salmonella* 분리를 시도함. 100마리의 가금 도체에서 총 38개의 *Salmonella* 균주가 분리되었음.

2) 가금 도체 유래 *Salmonella* 항생제 감수성 검사

- 본 연구팀에서 분리한 38종의 가금 도체 유래 *Salmonella* 대해 실시한 항생제 감수성 검사의 결과는 아래 <그림 >와 같음.

Salmonella Number	CIP	IMI	COL	FOT	AMP	AXO	TET	CHL	GEN	AZI	STR	AMI	NAL	SXT	FOX	TAZ	
230306_5	I	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	
230306_3	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	I	S	
230306_1	I	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	
230306_6	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S	I	S	
230306_7	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I	S	
230306_2	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	S	S	
230313_6	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	
230313_5	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230313_7	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S	I	S	
230517_1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
230517_9	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	I	S	
230523_8	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	S	I	S	
230523_4	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	
230523_2	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	
230523_10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
230531_6	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	S	I	S	
230531_5	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	S	I	S	
230531_9	I	S	S	R	R	R	R	R	I	I	S	S	R	S	I	S	
230531_3	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	
230531_10	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230531_1	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230605_6	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	S	S	
230605_2	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I	S	
230605_9	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I	S	
230619_1	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230619_3	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230619_4	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230619_7	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	S	
230619_8	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	I	S	
230717_7	I	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	I	S	
230703_7	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	
230703_1	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	R	S	I	S
230626_8	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230703_8	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	
230717_4	I	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230717_1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
230703_10	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	I	S	
230717_8	I	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	I	

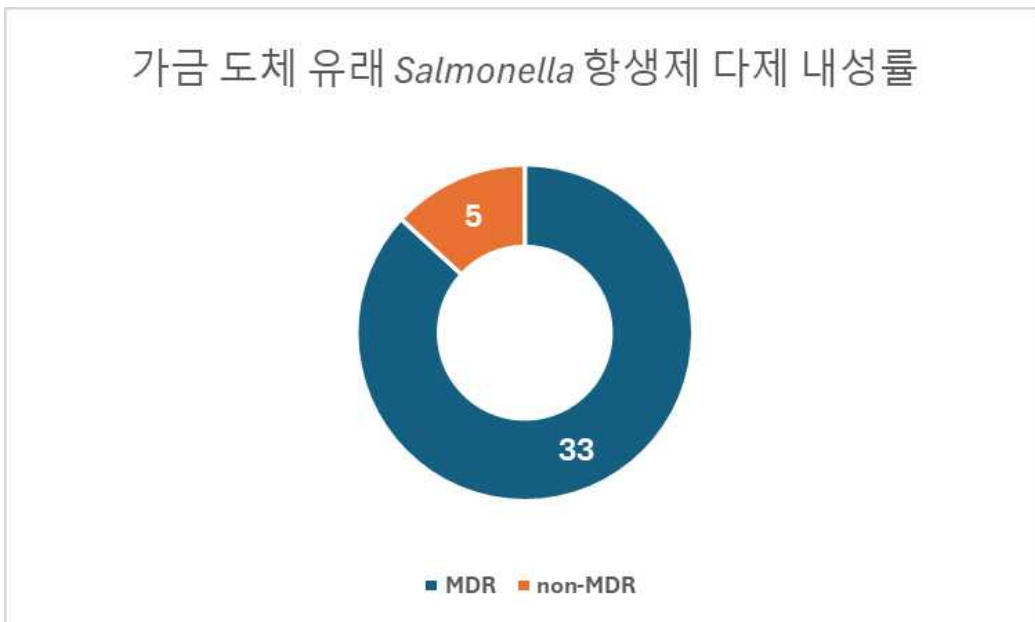
<국내 가금 도체 유래 *Salmonella* 38종의 항생제 감수성 검사 결과>

CIP-Ciprofloxacin, NAL-Nalidixic acid, IMI-Imipenem, COL-Colistin, AMP-Ampicillin, TET-Tetracycline, CHL-Chloramphenicol, AZI-Azithromycin, GEN-Gentamicin, STR-Streptomycin, AMI-Amikacin, SXT-Trimethoprim/Sulfamethoxazole, FOT-Cefotaxime, AXO-Ceftriaxone, FOX-Cefoxitin, TAZ-Ceftazidime

*I : intermediate, R: Resistant, S : Susceptible

내성 균주에 대해 빨간색으로 나타냄

- Sensititre panel에 포함된 총 10개의 계열(Class) 항생제 군 중 3개 이상의 계열, 각 계열별 항생제 1종 이상 내성을 나타내는 *Salmonella*를 다제내성 *Salmonella*로 판정함. 분리한 *Salmonella* 중 MDR(Multi-Drug Resistant) *Salmonella*의 비율은 <그림 >와 같음.



<그림 > 가금 도체 유래 *Salmonella* 중 다제내성균 비율

- 항생제 감수성 실험을 진행하여 38개의 *Salmonella* 중 33개의 *Salmonella* 균주가 MDR *Salmonella*로 판명되어 약 87%의 *Salmonella*가 MDR을 가지고 있는 것으로 나타남.

- 분리한 *Salmonella*에서 진행한 항생제 감수성 검사에서 각 항생제에 따른 내성 *Salmonella* 수는 Tetracycline에 내성을 가진 균이 34개로 가장 많았으며 Nalidixic acid가 33개, Ampicillin이 31개, Cefotaxime과 Ceftriaxone이 29개, Chloramphenicol이 27개, Trimethoprim/Sulfamethoxazole이 20개, Streptomycin이 8개, Gentamicin이 6개, Ceftazidime과 Colistin이 3개, 그리고 Ciprofloxacin, Imipenem, Azithromycin, Amikacin, Cefoxitin이 0개로 나타났음.

- Whole Genome Sequencing을 통해서 다제내성 살모넬라가 보유한 항생제 내성 유전자는 아래 <표>와 같음.

<표> 다제내성 살모넬라가 보유한 항생제 내성 유전자

#FILE	NUM_FOUND	aac(3)_IId_1	aac(3)_IVa_1	aac(6)_Iaa_1ant(3)_Ia_1	aph(3)_Ia_3	aph(3)_Ia_7	aph(4)_Ia_1	blaCIX_M_1	blaCIX_M_6	blaIIM_176	dfrA14_5	floR_2	qnrS1_1	sul1_5	tet(A)_6
230306-1.abricate.tsv	7														
230306-2.abricate.tsv	9														
230306-3.abricate.tsv	9														
230306-5.abricate.tsv	7														
230306-6.abricate.tsv	9														
230306-7.abricate.tsv	9														
230313-5.abricate.tsv	9														
230313-7.abricate.tsv	8														
230517-9.abricate.tsv	9														
230523-2.abricate.tsv	4														
230523-4.abricate.tsv	4														
230523-8.abricate.tsv	9														
230531-10.abricate.tsv	10														
230531-1.abricate.tsv	10														
230531-3.abricate.tsv	4														
230531-5.abricate.tsv	7														
230531-6.abricate.tsv	7														
230531-9.abricate.tsv	8														
230605-2.abricate.tsv	10														
230605-6.abricate.tsv	10														
230605-9.abricate.tsv	10														
230619-1.abricate.tsv	10														
230619-3.abricate.tsv	9														
230619-4.abricate.tsv	9														
230619-7.abricate.tsv	9														
230619-8.abricate.tsv	10														
230626-8.abricate.tsv	9														
230703-10.abricate.tsv	10														
230703-1.abricate.tsv	5														
230703-7.abricate.tsv	6														
230703-8.abricate.tsv	4														
230717-4.abricate.tsv	9														
230717-7.abricate.tsv	10														
230717-8.abricate.tsv	10														

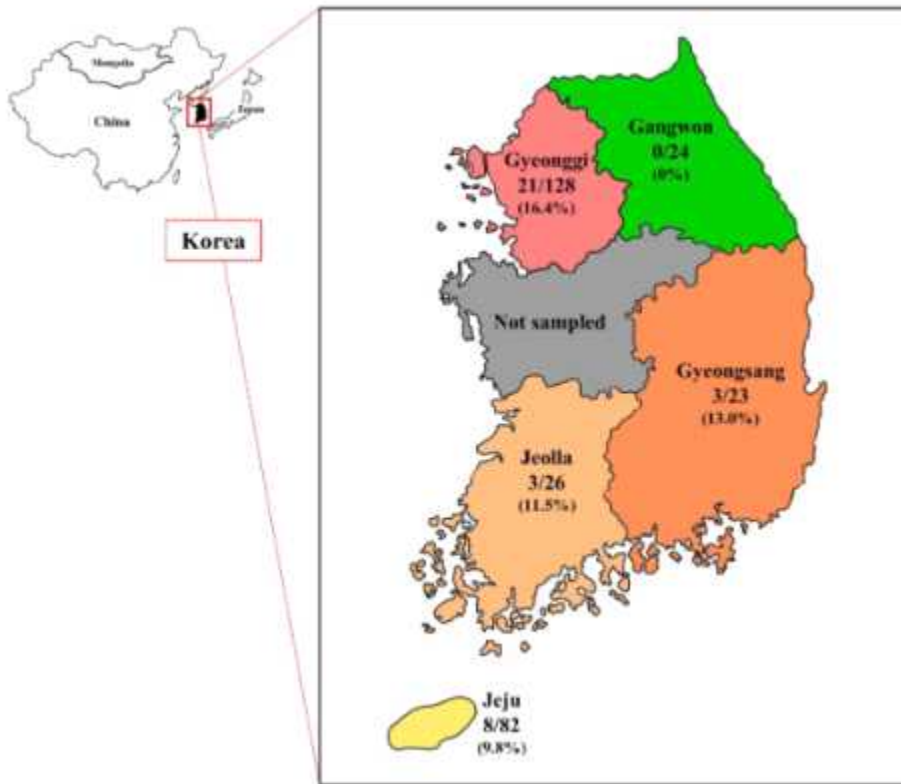
○ 3-3세부

- 인수 공통전염병성 바이러스인 E형 간염바이러스(Hepatitis E virus)의 검출을 위한 시료 확보
 - 국내 13개의 돼지 농장으로부터 분변 샘플 확보
 - E형 간염바이러스 RNA 추출 및 Nested RT-PCR (Reverse Transcriptase polymerase chain reaction) 진행
 - E형 간염바이러스 (Hepatitis E virus)의 검출 및 계통 분석 (Phylogenetic analysis)
 - E형 간염바이러스 ORF2 유전자 서열 확보 및 sequencing을 통해 계통 분석

3-3세부 (건국대 최인수)

● 3차년도: 인수 공통전염병 유발 병원체의 역학적 분석

- 1) 유전체의 염기서열 분석 결과와 국내외 검출된 유전체의 염기서열과 비교 분석
 - 국내외에서 검출된 바이러스 유전체의 염기서열과 비교하여 nucleotide 유사도 확인
- 전국의 말의 혈청을 ELISA 기법을 이용하여 검사하였음. 기존에 밝혀진 HEV의 자연숙주인 돼지에 비하여 혈청 내 HEV 항체 양성률은 더 낮았으며 이는 말이 돼지로부터 유래되어 감염되는 숙주 spillover)임을 시사함.



국내 말에서의 E형 간염 바이러스 항체 양성률

Region (Province)	Breed			Sex		Purpose			HEV positive	Age (years)			
	Thoroughbred	Warm-blood	Others	Female	Male	Gelding	Riding	Racing		Breeding	1-2	3-10	>10
Gangwon	0/5	0/1	0/18	0/17	0/4	0/3	0/20	-	0/4	0/24 (0%)	0/3	0/14	0/7
Gyeonggi	19/111	0/1	2/16	11/70	4/11	6/41	8/79	7/20	6/29	21/128 (16.4%)	5/16	5/49	11/63
Gyeongsang	1/5	1/6	1/12	3/13	0/1	0/9	3/23	-	-	3/23 (13.0%)	-	1/10	2/13
Jeju	3/33	3/14	2/35	4/35	1/11	3/16	5/45	0/2	3/35	8/82 (9.8%)	0/5	3/39	5/38
Jeolla	1/16	0/6	2/4	2/10	0/3	1/13	3/26	-	-	3/26 (11.5%)	0/1	3/9	0/16
Total	24/170 (14.1%)	4/28 (14.3%)	7/65 (8.2%)	20/171 (11.7%)	5/30 (16.7%)	10/62 (12.2%)	19/193 (9.8%)	7/22 (31.8%)	9/68 (13.2%)	35/263 (12.4%)	5/25 (20.0%)	12/121 (9.9%)	16/137 (13.1%)

국내 말에서의 조건 별 E형 간염 바이러스 항체 양성률

- 항체 외에 HEV 유전자의 역학적 분석을 위하여 PCR 기법을 이용하였음. PCR에 이용된 프라이머 세트는 다음과 같음.

Primer set		Sequence (5' → 3')	Product size	T _m	Number of cycles
Eq-HEV Pair 1 (<i>Orthohepevirus-A</i>)	External forward	GGD CTB GTT CAT AAC CTG AT	338 bp	48 °C	35
	External reverse	GGT TGG TTG GAT GAA TAT AGG			
	Internal forward	GTT CAT AAC CTG ATW GGY ATG CT	311 bp	50 °C	35
	Internal reverse	GGA TTG CGA AGG GCT GAG AAT CA			
Eq-HEV Pair 2 (<i>Orthohepevirus-A</i>)	External forward	TRT GGY TRC AYC CYG AGG G	830 bp	48 °C	35
	External reverse	TGC CTA TGY TGC CCG CGC	721 bp	50 °C	35
	Internal forward	TRT GGY TRC AYC CYG AGG G			
	Internal reverse	GGG CGR TGR TTR CGY TCC CA			
Eq-HEV Pair 3 (<i>Orthohepevirus-A</i>)	External forward	CGA ATG TKG CKC AGG TYT GTG	529 bp	48 °C	35
	External reverse	CAG CTG GGG YAG ATC GAC			
	Internal forward	TGG TAC ATA ACC TKA TTG GSA TG	361 bp	50 °C	35
	Internal reverse 1	ATT GTG ATA CGA CGT CGG AGG C			
Eq-HEV Pair 4 (<i>Orthohepevirus-A</i>)	Internal reverse 2	TGG CAT CTC CAT GCA CAG AGC	152 bp	55 °C	35
	External forward	CAA GGH TGG CGY TCK GTT GAG AC	506 bp		
	External reverse	CCC TTR TCC TGC TGA GCR TTC TC		456 bp	
	Internal forward	GVT CKG TTG AGA CCA CGG GYG			
	1		456 bp	55 °C	35
	Internal forward 2	GVT CKG TTG AGA CCT CTG GTG T			
Eq-HEV Pair 5 (<i>Orthohepevirus-A to C</i>)	Internal reverse	TTM ACW GTC RGC TCG CCA TTG GC	472 bp	50 °C	40
	External forward	TCG CGC ATC ACM TTY TTC CAR AA			
	External reverse	GCC ATG TTC CAG ACD GTR TTC CA	334 bp	50 °C	35
	Internal forward	TGT GCT CTG TTT GGC CCN TGG TTY			
	Internal reverse	CNA GGC TCA CCR GAR TGY TTC TTC			
		CA			

Abbreviations: HEV, hepatitis E virus; bp, base pair; PCR, polymerase chain reaction; T_m, melting temperature.

Degenerate primers: B (C, G, T); D (A, G, T); H (A, T, C); K (G, T); M (A, C); N (A, C, G, T); R (A, G); S (C, G); W (A, T); Y (C, T)

말에서의 E형 간염 바이러스 검출을 위해 사용된 프라이머 세트

- 도출된 결과를 기반으로 나이, 육종, 목적, 성, 및 양육 장소에 따른 E형 간염 항체 양성 비율을 통계학적으로 계약하였음. 결과적으로 경주마에서 높은 통계학적 유의미성을 보이는 것이 확인되었음..

Variables	Categories	P-value	OR	95% CI	
				Lower	Upper
Age	Regression analysis	0.696	1.012	0.9516	1.077
	1-2	0.212	1.9	0.664	5.44
	2-10	0.279	0.665	0.317	1.4
	> 10	0.703	1.15	0.565	2.33
Breed	Thorough-bred	0.273	1.52	0.715	3.25
	Warm-blood	0.762	1.2	0.392	3.7
	Others	0.167	0.545	0.228	1.3
Purpose	Riding	0.059	0.505	0.246	1.04
	Racing	0.01*	3.88	1.46	10.3
	Breeding	0.803	1.11	0.492	2.5
Sex	Female	0.672	0.857	0.418	1.75
	Male	0.393	1.49	0.529	4.18
	Gelding	0.955	0.978	0.447	2.14
Country of foaling	Domestic	0.083	0.519	0.245	1.1
	Foreign		1.93	0.909	4.09
	Gangwon	0.054	0.129	0.00768	2.17
Geographic region	Gyeonggi	0.061	1.98	0.961	4.07
	Gyeongsang	1	1.07	0.301	3.8
	Jeju	0.394	0.697	0.302	1.61
	Jeolla	1	0.917	0.26	3.23

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

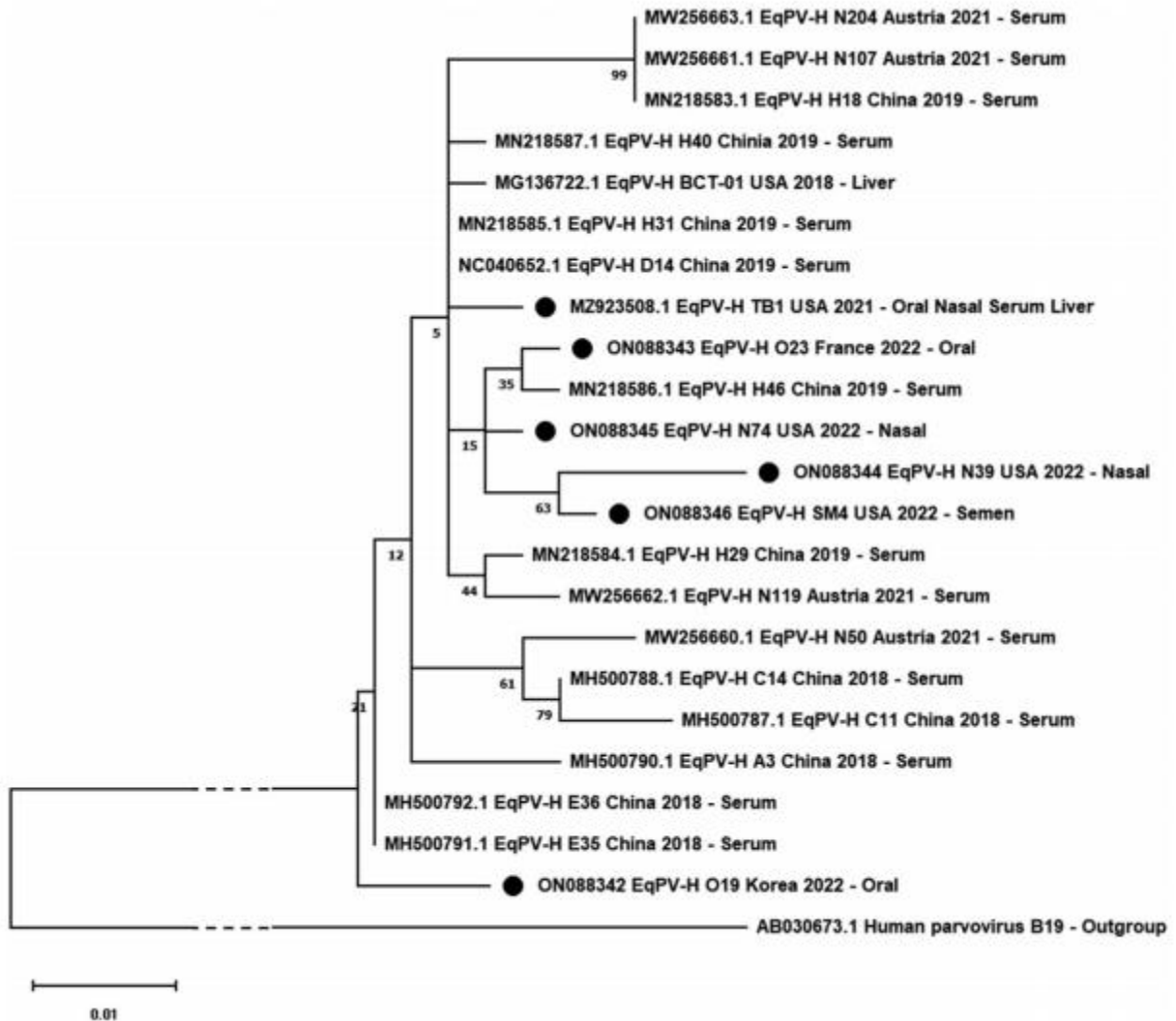
* P-value <0.05.

조건에 따른 E형 간염 항체 양성율의 통계학적 분석 결과

2) 계통분석을 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인

○ 국내외에서 검출된 바이러스 유전체 염기서열을 이용하여 phylogenetic analysis를 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인

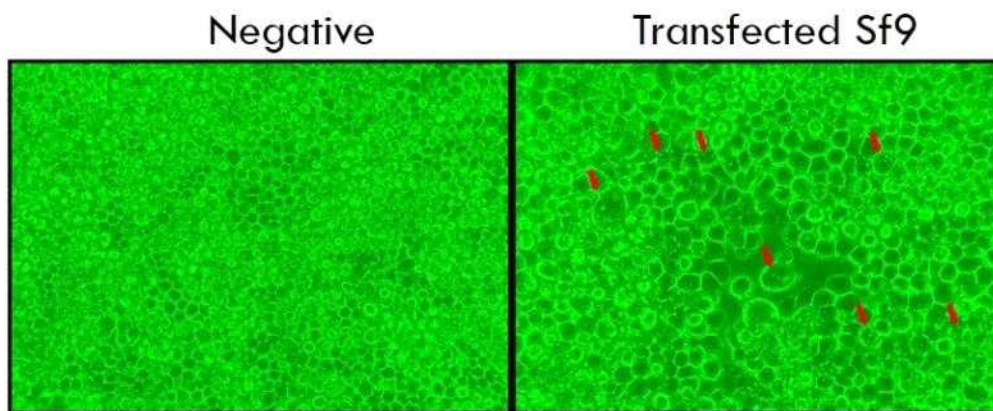
- E형 간염 외에 말에서 파보바이러스 및 간염바이러스와 연관이 있는 것으로 밝혀진 말-파보 간염 바이러스 또한 말에서 검출이 되었으며 국내에서 분리된 유전체의 유전자형과 아류형을 계통발생학적 분석(phylogenetic analysis)으로 확인하였음.



국내에서 검출된 말 파보-간염 바이러스의 계통발생학적 분석

○ HEV G3 capsid 항원 단백질 발현

- HEV capsid 유전자가 삽입된 재조합 baculovirus를 제작한 후, sf9 단백질 발현 세포에 transfection 시켰음. Transfection 이후 sf9 단백질 발현 세포의 CPE(Cytopathic effect)가 발생되는지 확인하였음. 전체 sf9 단백질 발현 세포 중 죽은 세포의 비율을 계산하고 60~80%가 되었을 때, 발현된 HEV 항원 단백질을 수거하였음.



Baculovirus에 감염된 Sf9 단백질 발현 세포의 모습

	Dead cell No.	Total cell No.	Death/Total (%)
HEV G3	1128	1831	61.6
HEV G4	883	1206	73.2

Sf9 단백질 발현 세포의 CPE 발생 비율

○ HEV G3 및 G4 capsid 항원의 정제

- sf9 발현 세포 배양 배지에 존재하는 HEV capsid 항원 이외에 sf9 단백질 발현 세포내의 HEV 항원 단백질을 얻기 위해 얼렸다 녹이는 과정을 3번 반복 후 20%의 amplitude 초음파 분쇄과정을 진행하였음. 고속 원심 분리를 6,000 X g에서 30분 동안 진행하여 sf9 세포를 제거하고 vaculovirus 및 sf9 cell을 제거하기 위해 Milipore durapore 0.2um filter 를 사용하여 제거하였음.

- 그 후 수거한 HEV 항원 단백질을 18000 X g, 1시간 30분동안 초고속 원심 분리를 실시하여 pellet 을 형성시키고, 형성된 pellet을 TNE buffer로 suspension 시켰음. TNE buffer로 suspension 된 HEV 항원 단백질을 sucrose gradient 기법을 이용하여 정제 과정을 거쳤음. 50,40,30,20,10% sucrose solution 순으로 층을 만들어 suspension된 HEV 항원단백질을 loading 후 35000 X g 2시간 30분 초고속 원심분리 과정을 거쳤음. 침강계수에 따라 각 농도별 sucrose solution 사이에 하얀색 단백질 band가 관찰되었음



Sucrose gradient 과정을 거쳐 침강계수에 따른 HEV 항원 단백질 분리

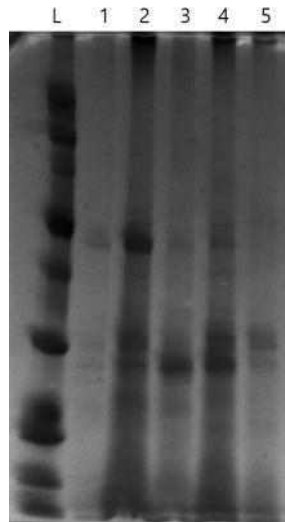
- 각 단백질 밴드별로 채취된 모든 항원을 50kDa 단백질 투과막과 ammonium bicarbonate buffer 로 dialysis를 진행하여 assembly되지 않은 viral capsid 항원을 모두 제거하였음.

○ 정제된 HEV capsid 단백질 검증 및 단백질 농도 측정

- 정제 과정을 거친 HEV G3 및 G4 capsid 단백질을 확인하기 위해 SDS-PAGE gel에서 전기영동 후 coomassie staining 과정을 거쳐 26kDa 크기의 band가 보이는지 확인하였음.

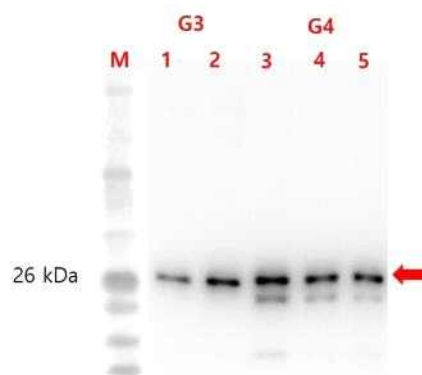
- 또한, 동일한 SDS-PAGE 과정을 진행 후 Nitrocellulose membrane에 transfer하고, 2.5% skim milk에 희석한 anti-HEV capsid monoclonal antibody와 1시간 반응 시키고 western blot analysis를 진행하였음. G3 capsid 단백질은 본 실험조건에서 사용된 5개 sucrose gradient 층 중 20-30%,30-40%에서 확인되었고, G4 capsid 단백질은 20-30%, 30-40%, 40-50%에서 확인되었음. 그 중 30-40% sucrose gradient 층에서 HEV capsid G3 및 G4 단백질이 가장 많이 포함되어 있었음.

- sucrose gradient의 각층에서 회수된 단백질 농도를 측정하였을 때, 30-40% 층에서 회수된 단백질의 농도가 높았음. 30-40% 층에서 G3 capsid 단백질은 5.35 mg/ml 및 G4 capsid 단백질은 4.94mg/ml로 측정되었음.



정제된 HEV G3 및 G4 capsid 단백질 coomassie staining

Lane 1, G3 20-30%; 2, G3 30-40%; 3,G4 20-30%; 4, G4 30-40%; 5,G4 40-50%



정제된 HEV G3 및 G4 capsid 단백질 항원성 확인

Lane 1, G3 20-30%; 2, G3 30-40%; 3,G4 20-30%; 4, G4 30-40%; 5,G4 40-50%

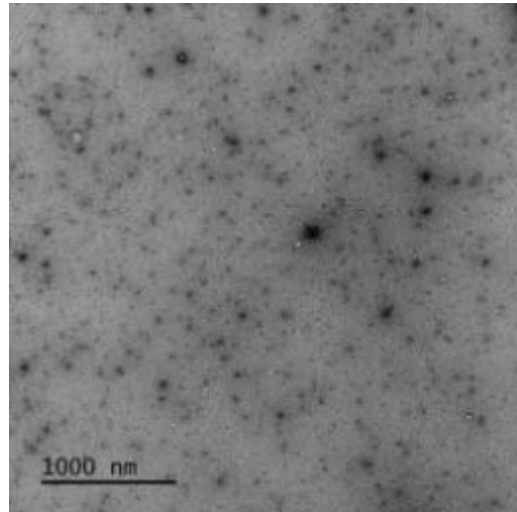
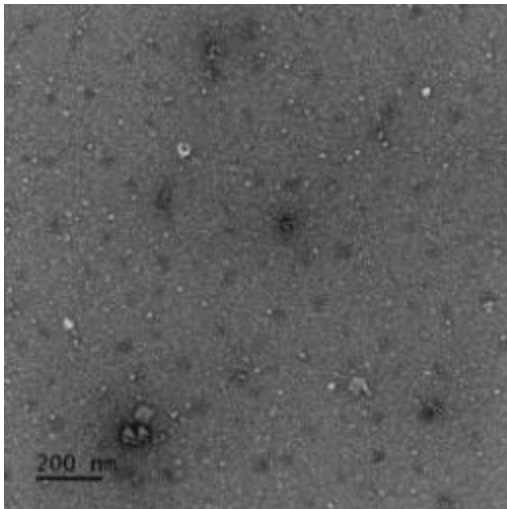
Genotype %	mg/ml
G3 20-30%	1.61
G3 30-40%	5.35
G4 20-30%	2.73
G4 30-40%	4.94
G4 40-50%	1.87

정제된 HEV capsid의 단백질 농도

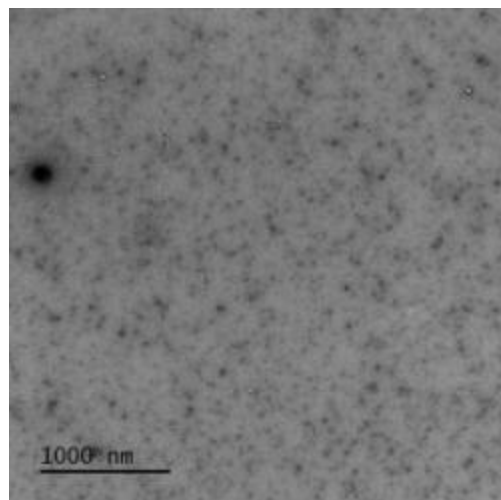
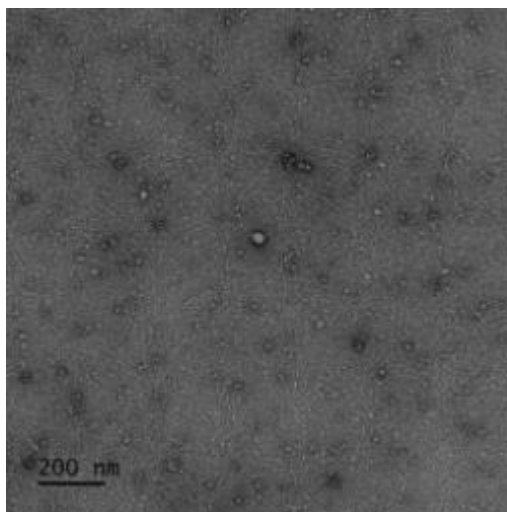
○ HEV G3 capsid로 구성된 virus-like particle (VLP) 확인

- Sucrose gradient 각 층별로 채취한 단백질을 정제한 후 HEV G3 capsid 단백질이 VLP를 형성하는지를 다음과 같이 확인하였음. HEV capsid에 특이적인 rabbit polyclonal antibody를 1차 항체로 사용하였고 gold particle이 부착된 anti-rabbit IgG monoclonal antibody를 2차 항체로 사용하였음. 2차 항체가 부착된 VLP 형상을 투과 전자 현미경(TEM)으로 확인하였음. Sucrose gradient 10-20% 층에서는 HEV VLP 형성을 확인할 수 없었음. 그러나 20-30%층에서는 HEV VLP가 확인되었음. 그 중 30-40% sucrose gradient 층에서 가장 많은 VLP가 확인되었음.

- 따라서 본 연구진은 정제된 HEV G3 VLP를 HEV 예방용 백신으로 사용하기로 결정한 후 동물실험을 통해 백신의 유효성을 평가하기로 하였음.



전자현미경 상으로 관찰된 20-30% sucrose solution 층에서 분리한 VLP



전자현미경 상으로 관찰된 30-40% sucrose solution 층에서 분리한 VLP

(2) 정량적 연구개발성과

○ 1-1 세부

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도		1단계	2단계	계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)				
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCIE)	목표(단계별)		3	4	7	
		실적(누적)		15	13	28	
	논문 (비SCIE)	목표(단계별)		2	3	5	
		실적(누적)		3	1	4	
	특허출원	목표(단계별)		1	2	3	10
		실적(누적)		1	1	2	
	특허등록	목표(단계별)		0	2	2	10
		실적(누적)		0	0	0	
	생명자원	목표(단계별)		3	3	6	10
		실적(누적)		3	3	6	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)		0	2	2	10
		실적(누적)		0	4	4	
	기술료	목표(단계별)		0	20	20	10
		실적(누적)		0	22.3	22.3	
	고용창출	목표(단계별)		2	2	4	5
		실적(누적)		5	8	13	
	홍보전시	목표(단계별)		3	4	7	10
		실적(누적)		9	4	13	
	인력양성 (일반)	목표(단계별)		0	2	2	20
		실적(누적)		1	4	5	
	인력양성 (특수)	목표(단계별)		0	3	3	
		실적(누적)		0	4	4	
	인력양성 (취업)	목표(단계별)		0	5	5	15
		실적(누적)		1	0	1	
계	목표(단계별)		14	52	66	100	
	실적(누적)		38	64.3	102.3	86.67	

○ 1-2 세부

성과지표명			연도	1단계 (2020~2021)	2단계 (2022~2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	2	2	4		
		실적(누적)	7	6	13		
	논문 비SCI	목표(단계별)	2	2	4		
		실적(누적)	1	1	2		
	학술발표	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	3	13	16		
	특허출원	목표(단계별)	1	1	2	5	
		실적(누적)	1	3	4		
	특허등록	목표(단계별)	0	2	2	10	
		실적(누적)	0	1	1		
	품종등록	목표(단계별)	0	0	0	10	
		실적(누적)	0	0	0		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시 (건수)	목표(단계별)	0	3	3	10	
		실적(누적)	2	2	4		
	기술실시 (기술료)	목표(단계별)	0	10	10	15	
		실적(누적)	10	33	43		
	사업화 (제품화)	목표(단계별)	1	2	3	5	
		실적(누적)	1	2	3		
	사업화 (수출액)	목표(단계별)	0	50	50	5	
		실적(누적)	0	51	51		
	사업화 (고용창출)	목표(단계별)	2	2	4	5	
		실적(누적)	4	6	10		
	인력양성 (일반)	목표(단계별)	0	2	2	30	
		실적(누적)	4	4	8		
	인력양성 (특수)	목표(단계별)	0	3	3		
		실적(누적)	0	4	4		
	인력양성 (취업인력)	목표(단계별)	0	5	5		
		실적(누적)	0	4	4		
	홍보전시	목표(단계별)	2	2	4	5	
		실적(누적)	2	5	7		
계	목표(단계별)	10	85	95	100		
	실적(누적)	35	135	170	85		

○ 1-1 협동

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계 (2020~2021)	2단계 (2022~2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문(SCI)	목표(단계별)	2	0	2		
		실적(누적)	1	0	1		
	논문 (비SCI)	목표(단계별)	0	2	2		
		실적(누적)	0	0	0		
	특허출원	목표(단계별)	1	1	2	10	
		실적(누적)	1	1	2		
	특허등록	목표(단계별)	0	1	1	10	
		실적(누적)	0	1	1		
	학술발표	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	0	3	3		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	제품화	목표(단계별)	0	1	1	30	
		실적(누적)	1	2	3		
	매출액	목표(단계별)	0	400	400	30	
		실적(누적)	0	161.98	161.98		
	고용창출	목표(단계별)	1	0	1	10	
		실적(누적)	1	0	1		
	홍보전시	목표(단계별)	1	2	3	10	
		실적(누적)	0	3	3		
	계	목표(단계별)	5	407	412	100	
		실적(누적)	4	171.98	175.98	82.15	

○ 1-2 협동

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계	2단계	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCIE)	목표(단계별)	1	3	4	
		실적(누적)	1	2	3	
	논문 (비SCIE)	목표(단계별)	2	2	4	
		실적(누적)	2	0	2	
	특허출원	목표(단계별)		2	2	20
		실적(누적)		1	1	
	특허등록	목표(단계별)		1	1	20
		실적(누적)		0		
	생명자원	목표(단계별)				
		실적(누적)				
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)				
		실적(누적)				
	기술료	목표(단계별)				
		실적(누적)				
	고용창출	목표(단계별)				
		실적(누적)				
	홍보전시	목표(단계별)		4	4	20
		실적(누적)		0		
	인력양성 (일반)	목표(단계별)		4	4	40
		실적(누적)	2	2	4	
	인력양성 (특수)	목표(단계별)				
		실적(누적)				
	인력양성 (취업)	목표(단계별)		2	2	
		실적(누적)	1	4	5	
계	목표(단계별)		3	18	21	100
	실적(누적)		6	9	15	50

○ 2-1세부

성과지표명		연도	1단계 (2020-2021)	2단계 (2022-2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	2	2	4	
		실적(누적)	11	1	12	
	논문 비SCI	목표(단계별)	1	1	2	
		실적(누적)	0	1	1	
	학술발표	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	7	1	8	
	특허 출원	목표(단계별)	0	1	1	20
		실적(누적)	0	0	0	
	특허 등록	목표(단계별)	0	1	1	15
		실적(누적)	0	0	0	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성 석사	목표(단계별)	0	4	4	20
		실적(누적)	2	8	10	
	인력양성 박사	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	2	2	4	
	인력양성 취업	목표(단계별)	0	4	4	15
		실적(누적)	1	7	8	
	교육지도	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	0	1	1	
	홍보전시	목표(단계별)	1	1	2	15
		실적(누적)	3	1	4	
	기타 (수상 등)	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	2	3	5	
	사업화	목표(단계별)	0	1	1	15
실적(누적)		0	0	0		
계	목표(단계별)	4	15	19	100	
	실적(누적)	28	25	53	50	

○ 2-2세부

성과지표명		연도	1단계 (2020-2021)	2단계 (2022-2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	2	2	4	
		실적(누적)	0	2	2	
	논문 비SCI	목표(단계별)	1	1	2	
		실적(누적)	1	3	4	
	학술발표	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	2	8	10	
	특허 출원	목표(단계별)	0	1	1	15
		실적(누적)	0	1	1	
	특허 등록	목표(단계별)	0	1	1	15
		실적(누적)	0	0	0	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성 석사	목표(단계별)	0	3	3	15
		실적(누적)	1	5	6	
	인력양성 박사	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	0	1	1	
	인력양성 취업	목표(단계별)	0	3	3	10
		실적(누적)	1	0	1	
	홍보전시	목표(단계별)	1	1	2	10
		실적(누적)	0	3	3	
	기타 (수상 등)	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	2	3	5	
	기술이전	목표(단계별)	1	0	1	10
		실적(누적)	1	0	1	
	기술료	목표(단계별)	20백만원	0	20백만원	10
실적(누적)		20백만원	0	20백만원		
사업화	목표(단계별)	1	0	1	15	
	실적(누적)	0	0	0		
계	목표(단계별)	6, 20백만원	38	18, 20백만원	100	
	실적(누적)	8, 20백만원	26	34, 20백만원	70	

○ 2-3세부

성과지표명			연도	1단계 (2020-2021)	2단계 (2022-2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	2	2	4		
		실적(누적)	3	3	6		
	논문 비SCI	목표(단계별)	1	1	2		
		실적(누적)	0	1	1		
	학술발표	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	2	2	4		
	특허 출원	목표(단계별)	0	1	1	20	
		실적(누적)	0	1	0		
	특허 등록	목표(단계별)	0	1	1	15	
		실적(누적)	0	0	0		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성 석사	목표(단계별)	0	3	3	20	
		실적(누적)	1	2	3		
	인력양성 박사	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	1	1	2		
	인력양성 취업	목표(단계별)	0	3	3		
		실적(누적)	0	3	3		
	교육지도	목표(단계별)	0	3	0	15	
		실적(누적)	0	3	3		
	홍보전시	목표(단계별)	1	1	2	15	
		실적(누적)	1	1	2		
	사업화	목표(단계별)	0	1	1	15	
		실적(누적)	0	0	0		
계	목표(단계별)	4	16	20	100		
	실적(누적)	8	17	25	50		

○ 3-1세부

성과지표명			연도	1단계 (2020-2021)	2단계 (2022-2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	2	2	4		
		실적(누적)	1	4	5		
	특허 출원	목표(단계별)	1	1	2	30	
		실적(누적)	0	2	2		
	특허 등록	목표(단계별)	1	1	2	30	
		실적(누적)	0	-	0		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	0	1	1	20	
		실적(누적)	0	-			
	기술료	목표(단계별)	0	10백만원	10백만원	20	
		실적(누적)	0	5백만원	5백만원		
계	목표(단계별)	4	5	9	100		
	실적(누적)	1	7	8	60		

○ 3-2세부

성과지표명			연도	1단계	2단계	3단계	4단계	계	가중치 (%)
				(2020-2021)	(2021-2022)	(2022-2023)	(2023-2024)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 SCI	목표(단계별)	0	1	1	2	4		
		실적(누적)	0	1	1	1	3		
	특허출원	목표(단계별)	0	0	1	1	2	10	
		실적(누적)	0	0	1	1	0		
	특허등록	목표(단계별)	0	0	0	1	0	10	
		실적(누적)	0	0	0	1	0		
	기술실시	목표(단계별)	0	0	0	1	1	10	
		실적(누적)	0	0	0	0	0		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성 석사	목표(단계별)	1	2	0	2	3	35	
		실적(누적)	0	1	3	9	13		
	인력양성 취업	목표(단계별)	0	1	1	1	3	35	
		실적(누적)	0	1	1	3	5		
계	목표(단계별)	1	4	3	8	16	100		
	실적(누적)	0	3	6	11	20	80		

○ 3-3세부

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계	2단계	계	가중치 (%)
				(2020~2021)	(2022~2023)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCI)	목표(단계별)	1	2	3		
		실적(누적)	2	3	5		
	논문 (비SCI)	목표(단계별)	1	2	3		
		실적(누적)	0	1	1		
	특허출원	목표(단계별)	0	1	1	40	
		실적(누적)	0	1	1		
	특허등록	목표(단계별)	0	1	1	40	
		실적(누적)	0	0	0		
학술발표	목표(단계별)	0	0	0			
	실적(누적)	1	2	3			
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	인력양성	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	1	7	8		
	홍보실적	목표(단계별)	0	0	0	20	
		실적(누적)	0	3	3		
	수상실적	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	0	1	1		
계	목표(단계별)	2	6	8	100		
	실적(누적)	4	18	22	60		

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

1-1세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Virulence genes and antimicrobial resistance of pathogenic Escherichia coli isolated from diarrheic weaned piglets in Korea	Journal of Animal Science and Technology	도경효	62(4)	국내	KOREAN SOCIETY ANIMAL SCIENCE & TECHNOLOGY	SCIE	2020-07-31	2672-0191	100
2	Pyk2 downstream of G _{12/13} pathways regulates platelet shape change through RhoA/p160 ^{ROCK}	Biochemical and biophysical research communications	Preeti Kumari Chaudhary	526(3)	국외	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2020-04-04	0006-291x	40
3	Characterization of Integrin α IIb β 3-Mediated Outside-in Signaling by Protein Kinase C δ in Platelets	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	Preeti Kumari Chaudhary	21(18)	국외	MDPI	SCIE	2020-09-08	1661-6596	40
4	Role of GRK6 in the Regulation of Platelet Activation through Selective G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Desensitization	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	Preeti Kumari Chaudhary	21(11)	국외	MDPI	SCIE	2020-05-30	1661-6596	40
5	Characterization of canine hemangiosarcoma by ¹⁸ F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography	The Japanese journal of veterinary research	김상구	68(4)	국외	JAPANESE SOCIETY OF VETERINARY SCIENCE	SCIE	2020-11-30	0047-1917	40
6	사료 첨가 항생제 금지 전후 돼지 설사증 유래 대장균의 병원성 인자 및 항생제 내성 유전자	Korean journal of veterinary research = 대한수의학회지	Kyung-Hyo Do	60(3)	국내	대한수의학회	비SCI	2020-09-30	2466-1384	100
7	Antimicrobial Resistance Profiles of Escherichia coli from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed	ANTIBIOTICS-BASEL	Kyung-Hyo Do	9(11)	국외	MDPI	SCIE	2020-10-29	2079-6382	100
8	The GRKs Reactome: Role in Cell Biology and Pathology	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	Preeti Kumari Chaudhary	22(7)	국외	MDPI	SCIE	2021-03-25	1661-6596	50
9	마보플록사신 제품별 접종이 비육돈 목심 부위 이상육 발생에 미치는 효과	한국가축위생학회지	임창원	44(3)	국외	한국동물위생학회	비SCI	2021-09-13	1225-6552	100

10	Fenhexamid induces cancer growth and survival via estrogen receptor-dependent and PI3K-dependent pathways in breast cancer models	Food and chemical toxicology	고려은	149	국외	PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE	2021-03-01	0278-6915	50
11	First Clinical Cases of Spirometrosis in Two Cats in Korea	The Korean journal of parasitology	Joohyung Kim	59(2)	국외	KOREAN SOC PARASITOLOGY, SEOUL NATL UNIV COLL MEDI	SCIE	2021-04-01	0023-4001	40
12	Effects of needleless intradermal injection of multivalent foot and mouth disease vaccine on granuloma formation at neck region in fattening pigs	예방수의학회지	임창원	45(3)	국외	한국예방수의학회	비SCI	2021-09-01	2287-7991	50
13	Anti-obesity effects of Celastrus orbiculatus extract containing celastrol on canine adipocytes	Canadian Journal of Veterinary Research	Cho-Won Kim	85(3)	국외	CANADIAN VET MED ASSOC	SCIE	2021-07	1928-9022	50
14	Potential Roles of Iridoid Glycosides and Their Underlying Mechanisms against Diverse Cancer Growth and Metastasis: Do They Have an Inhibitory Effect on Cancer Progression?	Nutrients	Cho-Won Kim	13(9)	국외	MDPI	SCIE	2021-08-26	2072-6643	30
15	Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway	Biomolecules & Therapeutics	Eul-Bee Ko	-	국외	KOREAN SOC APPLIED PHARMACOLOGY	SCIE	2021-07-15	1976-9148	30
16	The Predominant Role of Arrestin3 in General GPCR Desensitization in Platelets	Journal of Clinical Medicine	Preeti Kumari Chaudhary	10(20)	국외	MDPI	SCIE	2021-10-15	2077-0383	50
17	Identification of Zoonotic Balantidoides coli in Pigs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and Its Distribution in Korea	Animals	Jae-Won Byun	11	국외	MDPI	SCIE	2021-09-10	2076-2615	50
18	An Insight into GPCR and G-proteins as Cancer Drivers	Cells	Soochong Kim	10	국외	MDPI	SCIE	2021-11-24	2073-4409	40
19	Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance genes of pathogenic Escherichia coli from diarrheic weaned piglets	Research in Veterinary Science	도경효	150	국외	Elsevier	SCIE	2022-12-20	0034-5288	100

20	Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from suckling piglets with colibacillosis	BMC Microbiology	서광원	22	국외	BMC	SCIE	2022-09-15	1741-2180	100
21	Comparative antimicrobial activity of human and monkey origin lactic acid bacteria on simian enteric bacteria	Journal of Biomedical and Translational Research	강필용	23(3)	국내	Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University	비SCI	2022-09-01	2508-1357	100
22	Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic characteristics of pathogenic <i>Escherichia coli</i> isolated from patients and swine suffering from diarrhea	BMC Microbiology	도경효	22	국외	BMC	SCIE	2022-08-16	0034-5288	100
23	Distribution of Gastrointestinal Parasitic Infection in Domestic Pigs in the Republic of Korea: Nationwide Survey from 2020-2021	The Korean Journal of Parasitology	이수빈	60(3)	국내	Korean Society of Pathologists	SCIE	2022-06-30	0023-4001	100
24	An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease	International Journal of Molecular Sciences	Preeti Kumari Chaudhary	23(11)	국외	MDPI	SCIE	2022-06-01	1661-6596	100
25	Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway	BIOMOLECULES & THERAPEUTICS	고은별	-	국외	Korean Society of Applied Pharmacology	SCIE	2022-05-01	1976-9148	100
26	Time-dependent effect of inhaled cigarette smoke exposure in the bleomycin-induced lung injury rat model	Environmental Toxicology	고려은	37	국외	John Wiley & Sons Inc.	SCIE	2022-05-01	1520-4081	100
27	Comparative Genetic Characterization of Pathogenic <i>Escherichia coli</i> Isolated from Patients and Swine Suffering from Diarrhea in Korea	Animals	도경효	13	국외	MDPI	SCIE	2023-03-24	2076-2615	100
28	Role of Prednisolone in Platelet Activation by Inhibiting TxA2 Generation through the Regulation of cPLA2 Phosphorylation	Animals	김상규	13(8)	국외	MDPI	SCIE	2023-04-11	2076-2615	40
29	Antiplatelet Effect of Daphnetin Is Regulated by cPLA2-Mediated Thromboxane A2 Generation in Mice	International Journal of Molecular Sciences	Preeti Kumari Chaudhary	24(6)	국외	MDPI	SCIE	2023-03-17	1422-0067	40

30	Shedding Light on the Cell Biology of Platelet-Derived Extracellular Vesicles and Their Biomedical Applications	Life-Basel	Preeti Kumari Chaudhary	13(6)	국외	MDPI	SCIE	2023-06-16	2075-1729	40
31	Outbreak of severe diarrhea due to zoonotic Cryptosporidium parvum and C. xiaoi in goat kids in Chungcheongbuk-do, Korea	Parasitology Research	Ah-Young Kim	112(9)	국외	Springer	SCIE	2023-09-01	1432-1955	30
32	Animal models of Shiga toxin-producing Escherichia coli infection	Journal of Applied Animal Research	도경효	52(1)	국외	Tatlor&Francis	SCIE	2024-01-07	0971-2119	100

○ 1-2세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	The effect of copper supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation	Theriogenology	최혜린	164	국외	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2021-01-27	0093-691x	15
2	Optimized Approaches for the Induction of Putative Canine Induced Pluripotent Stem Cells from Old Fibroblasts Using Synthetic RNAs	Animals	김은혜	10(10)	국외	MDPI	SCIE	2020-10-11	2076-2615	100
3	Characterization and comparison of genomic profiles between primary cancer cell lines and parent atypical meningioma tumors	Cancer Cell International	김은혜	20(1)	국외	BMC	SCIE	2020-07-28	1475-2867	100
4	Effect of Interleukin-7 on In Vitro Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes and Subsequent Developmental Potential after Parthenogenetic Activation	Animals	오동진	11(3)	국외	MDPI	SCIE	2021-03-08	2076-2615	20
5	Establishment of 3D Neuro-Organoids Derived from Pig Embryonic Stem-Like Cells	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	황선웅	22(5)	국외	MDPI	SCIE	2021-03-05	1661-6596	10
6	R-Spondin 2 and WNT/CTNNB1 Signaling Pathways Are Required for Porcine Follicle Development and In Vitro Maturation	Animals	황선웅	11(3)	국외	MDPI	SCIE	2021-03-05	2076-2615	10
7	Heart defects and embryonic lethality in Asb2 knock out mice correlate with placental defects	CELLS & DEVELOPMENT	박슬기	165()	국외	MARY ANN LIEBERT INC	SCIE	2021-03-31	2667-2901	33
8	Exploring the mechanism of trehalose: dual functions of PI3K/Akt and VPS34/mTOR pathways in porcine oocytes and cumulus cells	Biology of Reproduction	Lian Cai	2	국외	OXFORD UNIV PRESS INC	SCIE	2022-08-01	0006-3363	10
9	Physiological and Functional Roles of Neurotrophin-4 During In Vitro Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes	Frontiers in Cell and Developmental Biology	김미래	-	국외	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2022-07-08	2296-634X	10
10	Neurotrophic factors in the porcine ovary: Their effects on follicular growth, oocyte maturation, and developmental	Frontiers in Veterinary Science	김미래	-	국외	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2022-08-10	2297-1769	10

competence										
11	Copper deficiency affects the developmental competence of porcine oocytes matured in vitro	Frontiers in Cell and Developmental Biology	최혜린	-	국외	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2022-09-07	2296-634X	10
12	The effect of C-C motif chemokine ligand 2 supplementation on in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation	Frontiers in Veterinary Science	김소희	10	국외	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023-02-17	2297-1769	50
13	Antioxidant effect of ergothioneine on in vitro maturation of porcine oocytes	Journal of Veterinary Science	정지영	24(2)	국내	KOREAN SOC VETERINARY SCIENCE	SCIE	2023-03-13	1229-845X	15
14	Supplementation of fetal bovine serum increased the quality of in vitro fertilized porcine embryo	Journal of Advanced Veterinary and Animal Research	Dibyendu Biswas	8	국외	NETWORK VETERINARIAN S BANGLADESH	비SCIE	2021-12-08	2311-7710	50
15	Primary copper-associated chronic hepatitis without copper metabolism domain containing 1 mutation in a Dalmatian : a case report	Korean Journal of Veterinary Research	윤수민	62	국내	Korean Society of Veterinary Science	비SCIE	2022-12-01	2466-1384	40

○1-1협동

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013-2019 following introduction of FAdV-4 vaccines	Avian Pathology	Van Dam Lai	50	England	TAYLOR & FRANCIS	SCIE	2021.02.03	0307-9457	100

○ 1-2 협동

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Comparative analysis of serological tests and fecal detection in the diagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> infection	Korean J Vet Res	유한상	60	대한민국	대한수의학회	비SCIE	2020-09-30	2466-1384	40%
2	Performance comparison and evaluation of interferon-gamma assay kit for bovine tuberculosis diagnosis	Korean J Vet Serv	홍이곤	43	대한민국	한국가축위생학회	비SCIE	2020-12-15	1225-6552	100%
3	MicroRNA profiling in bovine serum according to the stage of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	PLoS One	유한상	16	미국	국립보건원	SCIE	2021-11-04	1932-6203	40%
4	A machine learning approach reveals a microbiota signature for infection with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> in cattle	Microbiology Spectrum	유한상	11	미국	American Society for Microbiology	SCIE	2023-01-20	2165-0497	40%

○ 2-1세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	An Easy and Economical Way to Produce a Three-Dimensional Bone Phantom in a Dog with Antebrachial Deformities	Animals	Lee HR et al	10(9)	스위스	MDPI	SCIE	2020-08-19	2076-2615	33
2	Antimicrobial Susceptibility and Association with Toxin Determinants in Clostridium perfringens Isolates from Chickens	Microorganisms	Wei B et al	8(11)	스위스	MDPI	SCIE	2020-11-19	2076-2607	33
3	The Occurrence of Antimicrobial-Resistant Salmonella enterica in Hatcheries and Dissemination in an Integrated Broiler Chicken Operation in Korea	Animals	Shang K et al	11(1)	스위스	MDPI	SCIE	2021-01-11	2076-2615	25
4	Longitudinal Study of the Distribution of Antimicrobial-Resistant Campylobacter Isolates from an Integrated Broiler Chicken Operation	ANIMALS	Kwon BR et al	11(2)	스위스	MDPI	SCIE	2021-01-20	2076-2615	20
5	Genetic diversity of extended-spectrum cephalosporin resistance in Salmonella enterica and E. coli isolates in a single broiler chicken	VETERINARY MICROBIOLOGY	Wei B et al	254()	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2021-03-01	0378-1135	25
6	Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin (ESC) Resistance in Salmonella Isolated from Chicken and Identification of High Frequency Transfer of blaCMY-2 Gene Harboring Plasmid In Vitro and In Vivo	Animals an open access journal from MDPI	Kwon BR et al	11(6)	스위스	MDPI	SCIE	2021-06-14	2076-2615	33
7	Clonal dissemination of Salmonella enterica serovar albany with concurrent resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfisoxazole, tetracycline, and nalidixic acid in broiler chicken in Korea	Poultry science	Wei B et al	100(7)	영국	ELSEVIER	SCIE	2021-07-31	0032-5791	33
8	Conjugative Plasmid-Mediated Extended Spectrum Cephalosporin Resistance in Genetically Diverse Escherichia coli from a Chicken Slaughterhouse	ANIMALS	Wei B et al	11(9)	스위스	MDPI	SCIE	2021-08-25	2076-2615	33
9	Evaluation of Safety and Protective Efficacy of waaJ and spiC Double Deletion Korean Epidemic Strain of Salmonella enterica Serovar Gallinarum	Frontiers in Veterinary Science	Zhang JF et al	8	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2021-11-16	2297-1769	50
10	Antimicrobial Resistance and PFGE Molecular Typing of Salmonella enterica Serovar Gallinarum Isolates from Chickens in South Korea from 2013 to 2018	ANIMALS	Zhang JF et al	12(1)	스위스	MDPI	SCIE	2021-12-30	2076-2615	33

11	Isolation and genomic characterization of avian reovirus from wild birds in South Korea	Frontiers in Veterinary Science	Kim SW et al	9	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2022-01-28	2297-1769	50
12	Avian Reoviruses From Wild Birds Exhibit Pathogenicity to Specific Pathogen Free Chickens by Footpad Route	Frontiers in Veterinary Science	Choi YR et al	9	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2022-02-24	2297-1769	50
13	Genetic characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus (IBDV) from in chickens in Korea	Korean Journal of Poultry Science	Park JY et al	50(4)	대한민국	한국가금학회	비SCI	2023-12-31	1225-6625	33

○ 2-2세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Isolation of multidrug-resistant (MDR) Mycobacterium bovis from a dog in Korea	Journal of Veterinary Medical Science	조호성	84(10)	국외	MDR	SCI	2022-10-01	1347-7439	50
2	가축 전염병 관리를 위한 돼지 사체의 화학적 처리 방법	KJVS	오연수	44(4)	국내	KJVS	비SCI	2021-12-27	1225-6552	25
3	Alteration of the Gut Microbiota in Pigs Infected with African Swine Fever Virus	Veterinary Sciences	Young-Seung Ko	10(5)	국외	Veterinary Sciences	SCI	2023-05-18	2306-7381	50
4	Serological and molecular prevalence of lumpy skin disease virus in Korean water deer, native and dairy cattle in Korea	Korean Journal of Veterinary Service	aek Geun Lee	45(2)	국내	Korean Journal of Veterinary Service	비SCI	2022-06-30	1225-6552	100
5	Decadal analysis of livestock tuberculosis in Korea (2013 ~ 2022): Epidemiological patterns and trends	Korean Journal of Veterinary Service	Yeonsu Oh	46(4)	국내	Korean Journal of Veterinary Service	비SCI	2023-12-30	1225-6552	100
6	과학방역의 파트너, 한국-베트남 수의학분야 협력 활성화 방안 연구	베트남연구	조호성	21(1)	국내	베트남연구	비SCI	2023-06-21	2005-5331	100

○ 2-3세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model	International Immunopharmacology	Jae-won Seol	89	Netherlands	ELSEVIER	SCIE	2020.12.30	1567-5769	50
2	Ethanol Extract of Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae) Protects Against Type 2 Diabetes by Reducing Insulin Resistance and Hepatic Inflammation in Mice	JOURNAL OF MEDICINAL FOOD	Bumseok Kim	24(5)	United States	Larchmont	SCIE	2021.5.30	1096-620X	50
3	Comparison of Dentoalveolar Bony Defects Measurements by Dental Radiography and Computed Tomography in Companion Animals	Indian Journal of Animal Research	Youngkwon Cho	55(11)	India	DIVA ENTERPRISES PVT.LTD	SCIE	2021.12.14	0976-0555	50
4	Assessment of coagulation function by thromboelastography in dogs with mitral valve insufficiency	Korean Journal of Veterinary Service	Chul Park	45(1)	대한민국	The Korean Society of Veterinary Service	비SCI	2022.3.30	1225-6552	100

5	Anti-Inflammatory Effects of Aralia elata Extract Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice and Raw 264.7 Macrophage Cells Exposed to Lipopolysaccharide: First Report	Natural Product Communications	Hyun-Jin Tae	17(9)	England	Sage Journal	SCIE	2022.9.21	1934-578X	50
6	Effects of histamine and antihistamine on the hard tick Haemaphysalis longicornis during blood sucking	Parasite, Hosts and Disease	Myung-Jo You	61(2)	대한민국	The Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine	SCIE	2023.5.30	2982-5164	100
7	Efficacy of recombinant enolase as a candidate vaccine against Haemaphysalis longicornis tick infestation in mice	Parasite, Hosts and Disease	Myung-Jo You	61(4)	대한민국	The Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine	SCIE	2023.11.30	2982-5164	100

○ 3-1세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	A chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 vaccine is safe under international guidelines and effective both in experimental and field conditions	Research in veterinary science	Hwi-Yeon Choi	135	국외	ELSEVIER SCITD	SCIE	2021-03-01	0034-5288	100
2	Development of a Chimeric Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)-2 Vaccine Candidate Expressing Hypo-Glycosylated Glycoprotein-5 Ectodomain of Korean Lineage-1 Strain	Veterinary science	Hwi-Yeon Choi	9(4)	국외	MDPI	SCIE	2022-03-29	2306-7381	100
3	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Engineered by Serine Substitution on the 44th Amino Acid of GP5 Resulted in a Potential Vaccine Candidate with the Ability to Produce High Levels of Neutralizing Antibody	Veterinary science	Jong-Chul Choi	10(3)	국외	MDPI	SCIE	2023-03-03	1359-8139	100
4	Production of a chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 vaccine using a lab-scale packed-bed bioreactor CelCradle	BMC Veterinary Research	Hwi-Yeon Choi	105	국외	BMC	SCIE	2023-08-09	1750-2640	100
5	Rottlerin-Liposome Inhibits the Endocytosis of Feline Coronavirus Infection	Veterinary science	Jong-Chul Choi	10(6)	국외	MDPI	SCIE	2023-03-03	0950-2688	100

○ 3-2세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Inhibition of endocytosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by rottlerin and its potential prophylactic administration in piglets	Antiviral Research	Yeong-Lim Kang		국외	Elsevier	SCIE	2021.10.20	0166-3542	40%

2	Evaluation of Immune Responses and Protective Efficacy of a Novel Live Attenuated Salmonella Enteritidis Vaccine Candidate in Chickens	Vaccines	Hyunjin Shin	10	국외	MDPI	SCIE	2022.08.27	2076-393X	100%
3	Characteristics of a Temperature-Sensitive Mutant Strain of Salmonella Enteritidis and Its Potential as a Live Vaccine Candidate	Veterinary Sciences	Hyunjin Shin	10	국외	MDPI	SCIE	2023.04.25.	2306-7381	100%

○ 3-3세부

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Hemin as a novel candidate for treating COVID-19 via heme oxygenase-1 induction	scientific reports	Dong-Hwi Kim	11	england	NATURE RESEARCH	SCIE	21.11.02	2045-2322	100
2	First detection and genetic characterization of new equine parvovirus species circulating among horses in Korea	veterinary sciences	Jungho Yoon	8(11)	switzerland	MDPI	SCIE	21.11.07	2306-7381	100
3	Surveillance of hepatitis E virus in the horse population of Korea: A serological and molecular approach	Infection, Genetics and Evolution	Jungho Yoon		Netherlands	Elsevier	SCIE	22.06.20	1567-1348	100
4	Antiviral activity of canine interferon lambda 3 expressed using a recombinant adenovirus against canine coronavirus, canine parvovirus, and canine distemper virus	Veterinary Research Communications	Dong-Hwi Kim	103	Netherlands	Springer	SCIE	22.09.26	0165-7380	100
5	Molecular surveillance of equine parvovirus-hepatitis from oral, nasal, vaginal, and semen specimens collected from horses living in Korea	Transboundary and Emerging Diseases	Jungho Yoon		Germany	Wiley	SCIE	22.10.21	1865-1674	100
6	Experimental infection of a porcine kidney cell line with hepatitis A virus	Korean Journal of Veterinary Research	Dong-Hwi Kim	63(2)	South Korea	The Korean Society of Veterinary Science	비SCIE	23.06.30	2466-1384	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

○ 1-1세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020 Federation of European Microbiological Societies	도경효, 변재원, 이완규	2020.10.26	Belgrade	세르비아
2	대한수의학회 2020년 추계학술대회	도경효, 이완규	2020.11.19	강원도 홍천	대한민국
3	10 th International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine	도경효, 변재원, 이완규	2020.11.23	Brussel	벨기에
4	High prevalence of Balantidioides coli in pigs in Korea and its zoonotic potential	박정현	2021-07-19	Ireland, Dublin (온라인)	대한민국
5	Molecular detection of tick-borne pathogens in ticks in Chungcheong, Republic of Korea	Badriah ALKATHIRI	2021-10-28	충북대학교 개신문화관 2층 세미나실	대한민국
6	The 19th AAAP (Asian-Australasian Association of Animal Production) Animal Science Congress	도경효	2022-08-24	ICC JEJU, Jeju, Korea	대한민국
7	The 19th AAAP (Asian-Australasian Association of Animal Production) Animal Science Congress	최수진	2022-08-24	ICC JEJU, Jeju, Korea	대한민국
8	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	도경효	2022-04-28	대한민국 충북 청주 H호텔세종시티	대한민국
9	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	도경효	2022-04-28	대한민국 충북 청주 H호텔세종시티	대한민국
10	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	서광원	2022-04-28	대한민국 충북 청주 H호텔세종시티	대한민국
11	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	최수진	2022-04-28	대한민국 충북 청주 H호텔세종시티	대한민국
12	대한수의학회 2022년 춘계학술대회	강필용	2022-04-28	대한민국 충북 청주 H호텔세종시티	대한민국
13	Outbreak of cryptosporidiosis in neonatal goat kids in Chungcheongbuk-do, Korea and its association with dairrhea	김아영	2022-11-16	제주	대한민국
14	제30회 대한기초의학 학술대회	이수빈	2023-06-29	원주 연세대학교 미래캠퍼스	대한민국

○ 1-2세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	김은혜, 현상환	2020-08-20	KT대전인재개발원 제2연수관 중강당	대한민국
2	제39회 한국발생생물학회 정기학술대회	김은혜, 현상환	2020-10-30	성신여자대학교 난향관	대한민국
3	2020년 추계 대한수의학회	김은혜, 현상환	2020-11-19	강원도 홍천 소노벨비발디파크D	대한민국
4	2022년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	김미래, 현상환	2022-06-24	연세대학교 미래캠퍼스 미래관	대한민국
5	2022년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	김소희, 현상환	2022-06-24	연세대학교 미래캠퍼스 미래관	대한민국
6	2022년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	오동진, 현상환	2022-06-24	연세대학교 미래캠퍼스 미래관	대한민국
7	2022 International Society for Stem Cell Research (ISSCR)	김소희, 현상환	2022-06-14	San Francisco	미국
8	2022 Society for the Study of Reproduction (SSR)	김미래, 현상환	2022-07-26	Spokane	미국
9	2022 Society for the Study of Reproduction (SSR)	Lian Cai, 현상환	2022-07-26	Spokane	미국
10	대한수의학회 2023년 춘계국제학술대회	Zheng haomiao, 현상환	2023-04-20	알펜컨벤션센터	대한민국
11	대한수의학회 2023년 춘계국제학술대회	Ali Jawad, 현상환	2023-04-20	알펜컨벤션센터	대한민국
12	2023년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	Zheng haomiao, 현상환	2023-06-23	강릉원주대학교 (강릉캠퍼스) 교육지원센터	대한민국
13	2023 56th SSR Annual conference	Zheng haomiao, 현상환	2023-07-11	Shaw Centre	캐나다
14	2023 56th SSR Annual conference	Ali Jawad, 현상환	2023-07-11	Shaw Centre	캐나다
15	2023 춘계 대한수의학회	정무영	2023-04-21	알펜컨벤션센터	대한민국
16	European Buiatrics Congress and ECBHM Jubilee Symposium 2023	정무영	2023-08-24	베를린	독일

○ 1-1협동

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 AAAP (American Association of Avian Pathologists) annual meeting	박담희	2022.07.29 ~2022.08.02	필라델피아 (Sheraton Philadelphia Downtown)	미국
2	2023 AAAP (American Association of Avian Pathologists) annual meeting	박담희	2023. 06.11 ~2023.06.14	플로리다 (Sawgrass Marriott Golf Resort & Spa)	미국
3	2023년 추계국제학술대회	민경철	2023.11.29 ~2023.12.02	제주 (제주국제컨벤션센터)	대한민국

○ 1-2 협동

번호	발표제목	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	Genomic characteriztion of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> with Korean isolates by comparative genomic analysis	대한수의학회 추계학술대회	박홍태	2020-11-20	홍천	대한민국
2	miRNA profiling of putative biomarker candidates in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -infected cattle	대한수의학회 추계학술대회	최성운	2020-11-20	홍천	대한민국
3	Inducible responses of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> to human THP-1 cells revealed by single cell RNA-seq	World Microbe Forum	박홍태	2021-06-22	iPoster	미국
4	Identification of differentially expressed microRNAs in cattle infected with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> at different stages of infection	대한수의학회 추계학술대회	최성운	2021-10-29	군산	대한민국
5	How to apply the next-generation technologies to control animal diseases	6 th Asia-Pacific symposium on Food Safety 2021	유한상	2021-11-10	제주	대한민국
6	MicroRNA profiling in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -infected cattle at different stages of infection	10 th 2 nd Conference of Research Workers in Animal Diseases	최성운	2021-12-05	시카고 (Virtual)	미국
7	Comparative analysis of microbiome in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infected cattle	6 th mBiome International Conference	유한상	2021-12-09	서울	대한민국
8	Comparison of histopathological, immunological and metabolic changes in the early stages of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection through the murine model by different administration routes	대한수의학회 추계학술대회	이준호	2022-11-17	제주	대한민국
9	Enzootic bovine leucosis as a cause of productivity loss in three dairy farms in Korea	대한수의학회 추계학술대회	노영혜	2022-11-17	제주	대한민국
10	New <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> pathogenic genes and phenotypic characteristics of the gene through CRISPR interference system	대한수의학회 추계학술대회	이준호	2023-11-30	제주	대한민국
11	Characterization of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> mutants generated with CRISPRi system	10 th 4 th Conference of Research Workers in Animal Diseases	이준호	2024-01-22	시카고	미국

○ 2-1세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	(사)대한수의학회 2020년 추계학술대회	차세연	2020-11-19	소노벨 비발디파크 (온라인 충북대학교)	대한민국
2	(사)대한수의학회 2020년 추계학술대회	권보람	2020-12-19	소노벨 비발디파크 (온라인 충북대학교)	대한민국
3	(사)대한수의학회 2021년 추계학술대회	Islam MD s et al	2021-10-28	군산새만금컨벤션센터	대한민국
4	(사)대한수의학회 2021년 추계학술대회	Islam MD s et al	2021-10-28	군산새만금컨벤션센터	대한민국
5	(사)대한수의학회 2021년 추계학술대회	Park BY et al	2021-10-28	군산새만금컨벤션센터	대한민국
6	(사)대한수의학회 2021년 추계학술대회	Yoo YJ et al	2021-10-28	군산새만금컨벤션센터	대한민국
7	(사)대한수의학회 2021년 추계학술대회	Yoo YJ et al	2021-10-28	군산새만금컨벤션센터	대한민국
8	(사)대한수의학회 2022년 추계국제학술대회	Kim KW et al	2022-11-17	제주국제컨벤션센터	대한민국

○ 2-2세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020년 대한바이러스학회 연구회연합학술대회	조호성	2020-08-21	한국과학기술회관	대한민국
2	제33차 한국수의병리학회 추계학술대회	배다운	2021-11-05	온라인	대한민국
3	2022대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	조호성	2022-08-26	양양 을지인력개발원	대한민국
4	2022대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	배다운	2022-08-26	양양 을지인력개발원	대한민국
5	한국동물위생학회	조호성	2023-05-25	제주퍼시픽호텔	대한민국
6	한국동물위생학회	Chung-Joon Cho	2023-05-25	제주퍼시픽호텔	대한민국
7	대한수의학회 2023추계국제학술대회	조호성	2023-11-30	제주컨벤션센터	대한민국
8	대한수의학회 2023추계국제학술대회	Young-Seung Ko	2023-11-30	제주컨벤션센터	대한민국
9	대한수의학회 2023추계국제학술대회	MD. Samiul Haque	2023-11-30	제주컨벤션센터	대한민국
10	대한수의학회 2023추계국제학술대회	MD. Samiul Haque	2023-11-30	제주컨벤션센터	대한민국

○ 2-3세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	(사)대한수의학회 2020년 추계학술대회	유명조	2020.11.19	강원도 홍천 대명콘도	대한민국
2	(사)대한수의학회 2020년 추계학술대회	유명조	2020.11.19	강원도 홍천 대명콘도	대한민국
3	(사)대한수의학회 2023년 추계학술대회	유명조	2023.11.30	제주도 국제컨벤션센터	대한민국
4	(사)대한수의학회 2023년 추계학술대회	유명조	2023.11.30	제주도 국제컨벤션센터	대한민국

○ 3-1세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 26th International Pig Veterinary Society Congress	박범수	22.06.21	Rio de Janeiro 리우데자네이루	브라질

○ 3-2세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020년 추계 대한수의학회	이홍재	2020.11.19	강원도 홍천 소노벨비발디파크D	대한민국

○ 3-3세부

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회 2020년 추계학술대회	김동휘	2020.11.19	소노벨 비발디파크	대한민국
2	The 3rd Joint Meeting of Veterinary Science in East Asia	김다운	2023.05.01	National Pingtung	대만
3	대한수의학회 2023년 추계학술대회	김동휘	2023.11.30	소노벨 비발디파크	대한민국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

○ 1-1세부

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Escherichia coli KECS-0328	KACC 22171	KOREAN Agricultural Culture Collection(KACC)	2020
2	Escherichia ruysiae	BP1912237	Korean Collection for Type Cultures (KCTC)	2021
3	Escherichia coli KCTC-82397	KCTC 82397	Korean Collection for Type Cultures (KCTC)	2021
4	Escherichia coli KCTC-19042P	KCTC 19042P	Korean Collection for Type Cultures (KCTC)	2022
5	Salmonella typhimurium/KCTC 8228	KCTC 8228	Korean Collection for Type Cultures (KCTC)	2023
6	Salmonella typhimurium/KCTC 8229	KCTC 8229	Korean Collection for Type Cultures (KCTC)	2023

○ 1-1협동

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	가금 아데노바이러스 4형(ADL190734)	KCTC 14759BP	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	2021
2	가금 아데노바이러스 8b형(ADL190167)	KCTC 14760BP	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	2021
3	가금 아데노바이러스 11형(ADL182047)	KCTC 14761BP	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

○ 1-1세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	신규한 Colistin 항생제 내성 유전자를 포함한 병원성 Escherichia coli 균주	대한민국	도경효	2021-11-30	10-2021-0167853	-	-	-	-	100	X
2	베타-락탐계 항생제 내성 유전자 blaCTX-M-229 및 퀴놀론계 항생제 내성 유전자 qnrS를 갖는 신규한 다제내성 대장균 균주 및 이의 용도	대한민국	이완규	2022-11-09	10-2022-0148459	-	-	-	-	100	X

○ 1-2세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	ICT 돈사 관리 시스템	대한민국	송제민, 현상환,강 병철	2021.11. 05.	10-2021 -014958 0	-	-	-	-	-	0
2	인터루킨 (Interleukin, IL)-7을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용 배지 조성물	대한민국	충북대학 교 산학협력 단	2022.03. 17	9-5-202 2-08564 4636	-	충북대학 교 산학협력 단	-	-	50%	-
3	돈사 발병 예방, 예측 및 돈사 관리를 위한 수식 Generator	대한민국	(주)터보 소프트	2024.01. 04	10-2024 -000149 1	-	-	-	-	100%	-
4	우량암소선발을 위한 보정 육종가 및 우량암소 선별지수 계산방법 및 장치	대한민국	(주)터보 소프트	2024.01. 04	10-2024 -000158 6	-	-	-	-	100%	-

○ 1-1협동

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	신규한 가금 아데노바이러스 및 이를 유효성분으로 포함하는 가금 아데노바이러스 다가백신	대한민국	주식회사 중앙백신 연구소	2021.12. 13	10-2021 -017763 6	-				100	
2	가금 아데노바이러스 혈청형 판별을 위한 멀티플렉스 PCR용 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	주식회사 중앙백신 연구소	2023.04. 24.	10-2023 -005308 4	-	주식회사 중앙백신 연구소	2023.10. 26	10-2596 123	100	

○ 2-2세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	증식성 회장염 감염 돼지로부터 분리된 신규 로소니아 인트라셀룰라리스 균주 및 이를 포함 하는 돼지 증식성 회장염 예방용 백신 조성물	대한 민국	전북대 학교산 학협력 단	2022-10 -21	10-2022-01 36146					50	

○ 2-3세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	에놀라아제 단백질을 유효성분으로 포함하는 진드기 감염 예방용 백신 조성물 및 이의 용도	대한 민국	전북대 학교산 학협력 단	2024년 2월14일	특 허 -2024-0020 801					50	

○ 3-1세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	Korean Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and uses thereof	국내	건국대학교 산학협력단	2022.10.12	제10-2022-0130839호				100%		
2	PRRS 기저질환이 있는 자돈의 연쇄상구균의 치료를 위한 효과적인 천연항생제의 발굴과 적용	국내	건국대학교 산학협력단	2022-10-28	제10-2022-0141661				100%		

○ 3-2세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	살모넬라 갈리나룸 9 계통 유래주와 야외주 감별진단용 프라이머 세트와 감별진단법	국내	이상원	2022.11.23	10-2022-0158725	2016-03-1581-1			100%	x	
2	살모넬라 엔테리티디스 온도감수성 변이주 및 이의 용도	국내	이상원	2023.08.24	10-2023-0111100	2015-11-1674-8			100%	x	

○ 3-3세부

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	Heme oxygenase-1 유도에 의한 Hemin의 COVID-19의 치료 효능 평가	대한민국	건국대학교 산학협력단	22.10.31	10-2022-0142833				100		

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

○ 1-2세부

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율
1	ICT(정보 통신 기술) 돈사 관리 시스템	2021.10.15	(주)터보소프트	2021.11.05	2021-050291	(주)터보소프트	100%
2	ICT 돈사 관리 시스템v1.2	2023.11.01	(주)터보소프트	2023.12.15	C-2023-024951	(주)터보소프트	100%

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

○ 1-1협동

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	포울샷 아데노 3가 시험백신	2021.06.29.	주식회사 중앙백신연구소	-	전임상평가	3년		

□ 기술 실시(이전)

○ 1-1세부

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	양도	장내 병원성 대장균의 부착인자 및 병원성인자 분석기술	(주)코쿤	2022-11-01	3,300,000원	1건
2	양도	반려동물 의약품 및 의료장비에 관한 노하우 이전	(주)테라셀바이오앤사이언스	2023-04-10	2,750,000	1회
3	양도	반려동물 의약품 및 의료장비에 관한 노하우 이전	(주)테라셀바이오앤사이언스	2023-04-10	11,000,000	1회
4	양도	인간 면역화 동물모델 제작 기술	오토텔릭바이오(주)	2023-07-01	5,250,000	1회

○ 1-2세부

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	양도	ICT 접목기술 개발을 위한 미경산돈 발정기 행동학적 평가 노하우	(주)터보소프트	2020-04-27	5,000,000원	1건
2	양도	ICT 접목기술 개발을 위한 모든 분만시 행동학적 평가	(주)터보소프트	2021-04-05	5,000,000원	2건
3	양도	ICT 기술 활용 이유자돈 행동학적 DB 수집 기술	(주)터보소프트	2022-03-02	5,000,000원	3건
4	양도	ICT 기술 활용 모든 발정주기에 따른 행동학적 평가 기술	(주)터보소프트	2022-08-01	5,000,000원	4건
5	노하우	동물임상시험 통계분석 및 동물의약품 처방분석	(주)페토 하우스	2023-03-01	23,000,000원	5건

○ 2-2세부

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	재조합단백질 기반 구제역 백신 제작 기술	알씨케이	2021-11-24	20,000,000원	1건

○ 3-1세부

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1		PRRS 기저질환이 있는 자돈의 연쇄상구균의 치료를 위한 효과적인 천연항생제의 발굴과 적용	더레이크 주식회사	2023-12-20	5백만원	

□ 사업화 현황

○ 1-1협동

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	동물용의약품 제조품목 허가	동물용의약품 제조품목 허가	주식회사 중앙백신연구소	161,980	-	2023	10년

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

○ 1-1협동

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
동물용의약품 제조품목 허가	2023	161,980	-	161,980	
합계		161,980	-	161,980	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)				합계
			2020년	2021년	2022년	2023년	
1	1-1세부	충북대학교	1	4	3	5	13
2	1-2세부	충북대학교	2	3	2	4	11
3	1-1협동	중앙백신연구소	1	0	0	0	1
4	1-2협동	서울대학교	0	0	0	0	0
5	2-1세부	전북대학교	0	0	0	0	0
6	2-2세부	전북대학교	0	0	0	0	0
7	2-3세부	전북대학교	0	0	0	0	0
8	3-1세부	건국대학교	0	0	0	0	0
9	3-2세부	건국대학교	0	0	0	1	1
10	3-3세부	건국대학교	0	0	0	0	0
합계			4	7	5	10	26

□ 고용 효과

○ 1-1세부

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	13
		생산인력	0

○ 1-2세부

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	11
		생산인력	0

○ 1-1협동

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	0

○ 3-2세부

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	0

□ 기술 무역

○ 1-2세부

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입
1	2023-12	Porcine Behavior Analysis System	COCOONIN S INC.	United States of America	-	51,760	-	51,760	수출

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

○ 1-1세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1	농림수산 학계열	2021	박사	석사	학사	기타(취업)	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1			1	2			2			
2	농림수산 학계열	2022	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2			1	1		2			
3	농림수산 학계열	2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				4	1		3	2		5			
4	기타	2023			1			1					

○ 1-2세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1	농림수산 학계열	2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			1	3				4		3			1

○ 1-2협동

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1		2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1		1 (박사 후연구원)	2		2				

○ 2-1세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
1	농림수산학계열	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			2	2		1	3	2				5	
2	농림수산학계열	2022	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				3		2	5					5	
3	농림수산학계열	2023	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			2	1		5	6	2				8	
4	농림수산학계열	2024	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				4			3	1				4	

○ 2-2세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	농림수산학계열	2021		1		1		2				2	
2	농림수산학계열	2022		2			2					2	
3	농림수산학계열	2023		4			4					4	

○ 3-1세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	3-1세부	2022		1			1	0	1				
2	3-1세부	2023		10			7	3	10				

○ 3-2세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	일반	2021		1			1						
2	일반	2022	1	2			2	1					
3	취업	2022	1					1	1				
4	일반	2023	2	2			2	2					
5	특수	2023		5			5						
6	취업	2023	1	1				2	2				

○ 3-3세부

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	3-3세부	2020	1				1	0	1				
2	3-3세부	2022	3				2	1	3				
3	3-3세부	2023	4				2	2	4				

□ 교육지도

○ 2-1세부

번호	교육 및 컨설팅 명	주요 내용	참석대상	인원	교육장소
1	S706 네오 출시 심포지엄	닭 전염성 F낭병의 최근 발생 동향 및 고찰	관련 산업체 등	-	온라인

□ 홍보 실적

○ 1-1세부

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	공감언론뉴스	충북대 수의과대학, 동물 감염병 전문인력 양성	2020-02-03
2	Internet/PC통신	데일리벳	수의방역대학원 생긴다...동물방역 전문인력 양성에 100억 투입	2020-02-04
3	Internet/PC통신	한국대학신문	충북대 수의과대학, 농식품기술융합 창의인재양성사업 최종 선정	2020-02-04
4	지방일간지	충북 브레이크 뉴스	충북대 수의과대학, 수의방역대학원 설립·운영 위한 업무협약	2020-05-25
5	Internet/PC통신	데일리벳	충북대 수의대, 2021년도 수의방역대학원 석사과정 신입생 모집	2020-10-19
6	Internet/PC통신	브레이크뉴스	충북대 수의방역대학원, 중앙백신-크로넥스(주)와 업무협약	2021-04-01
7	Internet/PC통신	데일리벳	수의방역대학원, 국내 최초 수의방역 전문서적 번역 출간	2021-05-24
8	중앙TV방송	데일리벳	'수의방역의 이론 및 실제' 출간기념 이완규 충북대 수의방역대학원장을 만나다	2021-06-07
9	Internet/PC통신	브레이크뉴스	충북대 수의방역대학원, 성원메디칼과 업무협약	2021-06-17

10	Internet/PC통신	MIMINT뉴스	총북대 수의방역대학원, 대한공중방역수의사협회 업무협약	2022-10-05
11	Internet/PC통신	데일리벳	총북대 수의방역대학원 석사과정 모집 모집기간 11월 2일~11일	2022-10-12
12	Internet/PC통신	데일리벳	총북대 수의대, 2024년도 수의방역대학원 석사과정 신입생 모집	2023-10-17
13	Internet/PC통신	데일리벳	총북대 2023성봉수의학술제 성료	2023-11-09

○ 1-2세부

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	LAMB international	"글로벌 동물의료 시장 급성장에 주목...K-축산바이오·오가노이드 개발 분야 유망"	2020-05-04
2	Internet/PC통신	대학저널	총북대 수의방역대학원, ICT 방역기술, 방역복 연구한다	2021-04-12
3	Internet/PC통신	한국강사신문	총북대학교 수의학과 최혜린, 제41회 한국발생생물학회 정기학술대회 우수포스터상 수상	2022-08-25
4	Internet/PC통신	청주국제뉴스	총북대 오동진씨, 2022년 대한수의학회 우수포스터상 수상	2022-05-11
5	Internet/PC통신	동양일보	총북대 수의과대학 오동진, 김소희씨, 우수포스터상 수상	2023-01-25
6	Internet/PC통신	한국강사신문	총북대학교 수의학과 오동진씨, 「2023년 한국동물생명공학회 정기 학술대회」 '최우수 포스터상' 수상	2023-06-30
7	Internet/PC통신	한국강사신문	총북대학교 수의과대학 최혜린씨, 제56회 생식연구회 국제학술대회 '국제 초록 최우수상' 수상	2023-07-20

○ 1-1협동

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	인터넷 기사 홍보	축산경제신문	가금 아데노바이러스 3가 백신 출시 임박	2022.12.02
2	인터넷 기사 홍보	축산신문	가금 아데노바이러스 백신 품목허가	2023.04.21
3	인터넷 기사 홍보	데일리벳	국내 가금 아데노바이러스 3종 다발 '교차방어 어려워... 3가 백신 필요'	2023.07.28

○ 1-2협동

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전문지 기고	월간 낙농육우	요네병관리방안	2021. 6
2	중앙전문지	축산신문	경제적 피해 막대 "소 요네병" 근절 새장 열려	2021.12
3	전문지 기고	월간 낙농육우	구제역방역 현실적인 방안은?	2023. 7

○ 2-1세부

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	전북대학교 교내 사이트	전북대_우리 대학, 동물감염병 방역 전문인력 양성한다.	2020-06-15
2	Internet/PC통신	데일리벳	전북대 수의방역대학원, 2021년 입학생 모집	2020-11-03
3	Internet/PC통신	경향신문	2300만마리를 죽였다...'동물대학살' AI방역 이대로 괜찮나	2021-01-31
4	인터넷 뉴스	MK뉴스	전북대, 철새 바이러스 대응 위해 중국·일본연구소와 '맞손'	2022-04-24

○ 2-2세부

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	데일리벳	돼지농장 전실, 없으면 2주만에 20m안까지 병원체 침입한다	2023-06-07
2	Internet/PC통신	한길타임즈	전북대 조정준 대학원생, 한국동물위생학회 우수포스터상	2023-06-10
3	Internet/PC통신	한국강사신문	전북대학교 조정준 대학원생, 한국동물위생학회우수포스터상 수상	2023-06-13

○ 3-3세부

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	2024년도 신입생 모집	news1	건국대학교 대학원 2024 전기 석박사과정 모집	2023.09.19
2	2023후기 신입생 모집	dailyvet	건국대 수의방역대학원, 응용임상수의학과 만든다. 후기 신입생 모집	2023.05.09
3	2023년도 전기 학위수여식 총장상수상	헤럴드타임즈	건국대학교, 2023학년도 전기 학위수여식 개최... 4474명 학위 수여	2023.02.23

□ 포상 및 수상 실적

○ 1-1세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	2020 대한수의학회 우수포스터발표상	Excellent Poster Prize	Virulence and Antimicrobial resistance profiles of Escherichia coli from piglets with diarrhea after the ban on antibiotic growth promoters Kyung-Hyo Do was chosen as a receipt of the Excellent Poster Prize At 2020 Symposium held incommemoration of the KSVS November 20, 2020, Vivaldi Park, Hongcheon, Korea	도경효	2020-11-19	The Korean Society of Veterinary Science

○ 1-2세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	2021 발생공학 국제 심포지엄	발생공학 심포지엄 우수포스터상	2021년 발생공학 국제 심포지엄 포스터 발표부분 우수상	김미래	2021-10-15	한국동물생명공 학회
2	2021 추계 대한수의학회	대한수의학회 우수포스터상	대한수의학회 우수 포스터상	오동진	2021-10-29	대한수의학회
3	장관 표창	농림축산식품 과학기술 장관상	농림축산식품 과학기술대상 수상	현상환	2021-09-08	농림식품기술기 획평가원
4	2022년 춘계 대한수의학회	우수포스터상	2022년 대한수의학회 포스터 발표부분 우수 포스터상	오동진	2022-04-28	대한수의학회
5	2022년 충북대학교 우수박사학위 논문	우수박사학위 논문상	2022년 충북대학교 우수박사학위 논문상	김미래	2022-08-18	충북대학교
6	2022년 제41회 한국발생생물학회	우수 포스터상	한국발생생물학회 포스터 발표부분 우수 포스터상	최혜린	2022-08-20	사단법인 한국발생생물학 회
7	한국줄기세포학회 2023년 동계학술대회	우수 포스터상	한국줄기세포학회 2023년 동계학술대회 우수포스터상	김소희	2023-01-18	한국줄기세포학 회
8	한국줄기세포학회 2023년 동계학술대회	우수 포스터상	한국줄기세포학회 2023년 동계학술대회 우수포스터상	오동진	2023-01-18	한국줄기세포학 회
9	2023년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	최우수 포스터상	2023년 한국동물생명공학회 정기 학술대회 최우수 포스터상	오동진	2023-06-23	한국동물생명공 학회
10	56th SSR annual meeting	국제초록 최우수상	56th SSR annual meeting_국제초록 최우수상	최혜린	2023-07-14	Society for the study of reproduction

○ 2-1세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	2020 대한수의학회 상장	수의방역대학원장 상	2020년도 대한수의학회 추계학술대회 수의방역대학원장상 수상	권보람	2020-11-19	농식품기술융합 창의인재양성사업 수의방역대학원
2	총장상	총장상 (우수연구상)	학위과정 동안 우수 연구성과에 의한 학문 발전 기여	상가	2021-08-20	전북대학교
3	총장상	총장상 (우수연구상)	학위과정 동안 우수 연구성과에 의한 학문 발전 기여	유여진	2023-02-22	전북대학교

○ 2-2세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	국무총리표창	국무총리표창	동식물 방역방제 유공 국무총리 표창	조호성	2020-11-11	정부기관
2	학술상	학술상	제 33차 한국수의병리학회 추계학술대회 학술상기여	배다운	2021-11-05	한국수의병리학회

3	농식품부장관표창장	농식품부장관표창장	농식품부장관표창장	조호성	2022-12-30	농식품부
4	학술상	학술발표대회 학술상	제 45차 한국동물위생학회 학술발표대회 학술상	조호성	2023-05-26	한국동물위생학회
5	우수포스터발표상	학술발표대회 우수포스터발표상	제 45차 한국동물위생학회 학술발표대회 우수포스터발표상	조정준	2023-05-26	한국동물위생학회

○ 3-1세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	건국대학교 총장상	학업 성적 우수	오희성	23.08.22	건국대학교

○ 3-2세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	상장	건국대학교 원장상	위 사람은 본교 수의방역대학원 수의방역학과 수의방역전공 석사과정 재학 중 전 학기를 통하여 학업성적이 우수하므로 이에 상장과 부상을 수여함	양호열	2023.08.22.	건국대학교

○ 3-3세부

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	대학원 우수연구자상	대학원 우수연구자상	김동휘	2023.11.30.	대한수의사회

<대표증빙서류>

○ 1-1세부

논문-Animal models of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection



Journal of Applied Animal Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/taar20>

Animal models of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection

Kyung-Hyo Do & Kwangwon Seo

To cite this article: Kyung-Hyo Do & Kwangwon Seo (2024) Animal models of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, *Journal of Applied Animal Research*, 52:1, 2300625, DOI: [10.1080/09712119.2023.2300625](https://doi.org/10.1080/09712119.2023.2300625)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09712119.2023.2300625>



© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Published online: 07 Jan 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=taar20>

**AAAP-2022
SUB-0384**

Phylogenetic and Molecular characteristics of *Escherichia coli* from Diarrheic Weaned piglets and Human

Kyung-Hyo Do¹, Kwangwon Seo², Su-Jin Choe¹ and Wan-Kyu Lee^{1}*

¹Department of Veterinary Bacteriology and Infectious Disease, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Republic of Korea
²College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Republic of Korea

Introduction

Escherichia (E.) coli causes colibacillosis in swine and humans, and is frequently associated with antimicrobial resistance. In this study we aimed to compare antimicrobial resistance, O-serogroups, virulence genes, and multi-locus sequence type of *E. coli* between isolates from pigs and patients suffering from diarrhea, and the most prevalent pathogenic *E. coli* strain from swine isolates in Korea.

Materials and Methods

64 *E. coli* isolates from pigs
51 *E. coli* isolates from human

Slide agglutination test: O-serogroup
PCR: Virulence genes
Disk diffusion: Antimicrobial susceptibility

Multi-Locus Sequence Typing
(Seven house keeping gene)

Analyzing Genetic Relatedness via Minimum spanning tree

Results

Fig 1. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from diarrheic pigs and patients. GM: gentamicin; S: streptomycin; N: neomycin; CF: cephalothin; CZ: cefazolin; FEP: cefepime; FOX: cefoxitin; NA: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; NOR: norfloxacin; AMP: ampicillin; AMC: amoxicillin / clavulanic acid; SXT: trimethoprim / sulfamethoxazole; C: chloramphenicol; CL: colistin; TE: tetracycline. * Significant difference between origin of isolates ($p < 0.05$). ** Significant difference between origin of isolates ($p < 0.01$)

Fig 2. Virulence genes of *Escherichia coli* from diarrheic pigs and patients in Korea. * Significant difference between origin of isolates ($p < 0.05$). ** Significant difference between origin of isolates ($p < 0.01$).

Fig 3. Minimum spanning tree based on sequence type of *Escherichia coli* isolated from pigs and humans. White numbers in the circles indicate the MLST sequence type. Black colored number on line indicate the absolute distance between each sequence type. The node size vary linearly with the number of isolates of a given sequencing type.

Conclusion

In this study, we analyzed antimicrobial resistance, virulence genes, O-serogroups, and Multi-Locus Sequence Type of *E. coli* isolates of pigs and patients suffering from diarrhea.

- Both isolates from swine and patients had the *stx2* gene, which could cause severe disease, such as edema disease (swine) and hemorrhagic colitis (human).
- Isolates from swine showed significantly higher antimicrobial resistance than those from humans, especially in fluorquinolone and aminoglycosides.
- Isolates from both pigs and patients had similar virulence traits and they were phylogenetically similar

These results provide data that strengthen the understanding of cross-infection and the transfer of antimicrobial resistance through pathogenic *E. coli* between humans and pigs.

-265-

특허출원-베타-락탐계 항생제 내성 유전자 b l a C T X - M - 2 2 9 및 퀴놀론계 항생제 내성 유전자 q n r S 를 갖는 신규한 다제내성 대장균 균주 및 이의 용도

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.11.09
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(108517)
출원번호 10-2022-0148459 (접수번호 1-1-2022-1189987-34)
(DAS접근코드AC87)
출원인명칭 충북대학교 산학협력단(2-2004-016822-6)
대리인성명 특허법인 남앤남(9-2012-100182-6)
발명자성명 이완규
발명의명칭 베타-락탐계 항생제 내성 유전자 b l a C T X - M - 2 2 9 및
퀴놀론계 항생제 내성 유전자 q n r S 를 갖는 신규한 다제내성
대장균 균주 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 특허고객 상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr> 지식재산제도



Korean Collection for Type Cultures (KCTC)
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)
181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeonbuk 56212, South Korea

Certificate of Deposit

Ref.: 20231389

Date of issue: OCT 16, 2023

Taxonomic designation : *Salmonella typhimurium*
Accession number : **KCTC 8229**
Depositor(s) : Wan-Kyu Lee
Strain code by the depositor(s) : **CBUKPS009**

The above microorganism has been successfully deposited into the general collection of microorganism of the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and confirmed the identity of the microorganism under this KCTC number.

This microorganism will be available without restrictions for research and academic purposes in the publicly accessible section of the KCTC. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors.

A handwritten signature in black ink that reads 'Song-Gun Kim'. The signature is written in a cursive, flowing style.

Curator of Bacteria
Song-Gun Kim Ph.D.

노하우 이전 계약서

㈜테라셀바이오앤사이언스(이하 "테라셀바이오")과 충북대학교 산학협력단(이하 "산학협력단")은(는) "테라셀바이오"의 업무와 관련하여 다음과 같이 노하우 이전 계약(이하 "이 계약")을 체결한다.

제 1 조 (목적)

이 계약은 기술이전 책임자로 수의과대학 교수 최경철(이하 "최경철")로 하며, 제 3 조의 기술사항에 대하여 "최경철"이(가) 가진 기술, 노하우 및 정보 등을 "테라셀바이오"에게 제공, 지도, 교육하는 것과 관련하여 필요한 권리의무 사항을 명확히 하고자 한다.

제 2 조 (계약 기간)

이 계약의 수행기간은 2023 년 4 월 10 일에서 2023 년 10 월 09 일 (6 개월간)까지로 하며 계약당사자 상호 합의로 수행기간을 변경할 수 있다.

제 3 조 (기술 내용)

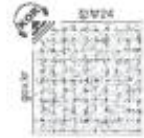
1. 이 계약에 따라 "최경철"이(가) "테라셀바이오"에게 수행해야 할 노하우의 범위 및 내용은 다음과 같다.
 - ① 반려동물 의약품 및 의료장비에 관한 노하우 이전
 - ② 수의학-의학 중개의학 연구 관련 전문 인적 네트워크 및 세미나 진행
 - ③ 반려동물의 종양 진단, 임상적 제어기술 개발 등을 통한 수의학-의학 중개의학 관련 기술 이전
 - ④ 반려동물 재생의학기술 개발을 통한 반려동물 맞춤형 진단, 세포치료제 및 항암제 기술 개발에 관한 노하우 이전
 - ⑤ 반려동물 맞춤형 의약품/의료기기를 활용한 정밀의료 적용 임상기술에 대한 최신 연구동향 및 최신 임상기술 노하우 이전
2. "테라셀바이오"은 필요한 경우 이 계약의 범위, 목적 및 내용을 크게 벗어나지 않는 한도 내에서 "최경철"과(와) 사전 협의를 거쳐 그 범위, 목적 및 내용의 변경을 요청할 수 있다.
3. "최경철"은(는) 이 계약의 수행을 위하여 필요한 경우 이 계약의 범위, 목적 및 내용의 본질을 해하지 않는 한도 내에서 "테라셀바이오"의 사전 서면 동의를 얻어 그 범위, 목적 및 내용을 일부 변경할 수 있다.

제 4 조 (비용 및 지불)

1. "테라셀바이오"은 이 계약에 따른 계약 대금을 다음과 같이 "산학협력단"에게 지급하기로 한다.(각 대금은 부가세 포함)



문서확인번호 : 1687-3334-4691-5693



건강보험자격득실확인서				
가입자	성명	주민등록번호		
	김나희	000314-4*****		
자격득실확인내역				
NO	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	충북대학교산학협력단	2023-03-01	
2	직장피부양자	엘에스일렉트릭(주)	2000-03-14	2023-03-01
건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.				
2023년 06월 21일				
국민건강보험공단이사장				
-직인생략-				

※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
 ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공민인 증서 필요)
 ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용으로 다른 용도(재직증명서, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.

◆본 증명서는 만타넷으로 발급되었으며, 정부24(gov.kr)의 인터넷발급문서진위확인 메뉴를 통해 위·변조 여부를 확인할 수 있습니다. (발급일로부터 90일까지) 또한 문서해단의 바코드로도 진위확인(정부24 앱 또는 스캐너를 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.





석사제 7 호

학 위 기

성명 김 아 영
1979년 9월 30일생

위 사람은 수의방역대학원 석사과정을
이수하고 소정의 시험과 논문심사에 합격하여
수의학석사(수의방역학)의 자격을 갖추었으므로
수의방역대학원위원회의 심의를 거쳐 이를 인정함.

2023년 8월 17일

수의방역대학원장 수의학박사 이



위의 인정에 의하여 수의학석사(수의방역학) 학위를 수여함.

2023년 8월 17일

충북대학교 총장

공학박사 고



학위번호 : 충북대2022(전문석)906

충북대 수의대, 2024년도 수의방역대학원 석사과정 신입생 모집

방역 현장 전문인력 양성..야간대학원으로 현장 종사자도 지원 가능

등록 : 2023.10.17 05:33:41 수정 : 2023.10.16 14:37:29

김예진 기자 v .

충북대학교 수의방역대학원이 2024년도 석사과정 신입생을 모집한다.

11월 1일(수)부터 10일(금)까지 진행될 이번 정시모집에서 수의방역대학원 석사과정 신입생 10명을 선발한다. 수의학과 졸업자는 물론 4년제 정규대학 졸업자, 2024년 2월 졸업예정자 등이 지원할 수 있다.

수의방역대학원은 국내 동물감염병에 대응할 현장 중심 전문가를 양성하기 위해 2020년 신설됐다.

야간과 주말에 운영되는 특수대학원으로, 대체복무 중인 공중방역수의사를 포함한 현장 종사자도 지원 가능하다.

신입생은 학부 성적(30%)과 면접·전공구술고사(70%)로 선발한다. 면접고사는 12월 1일(금) 열릴 예정이다.

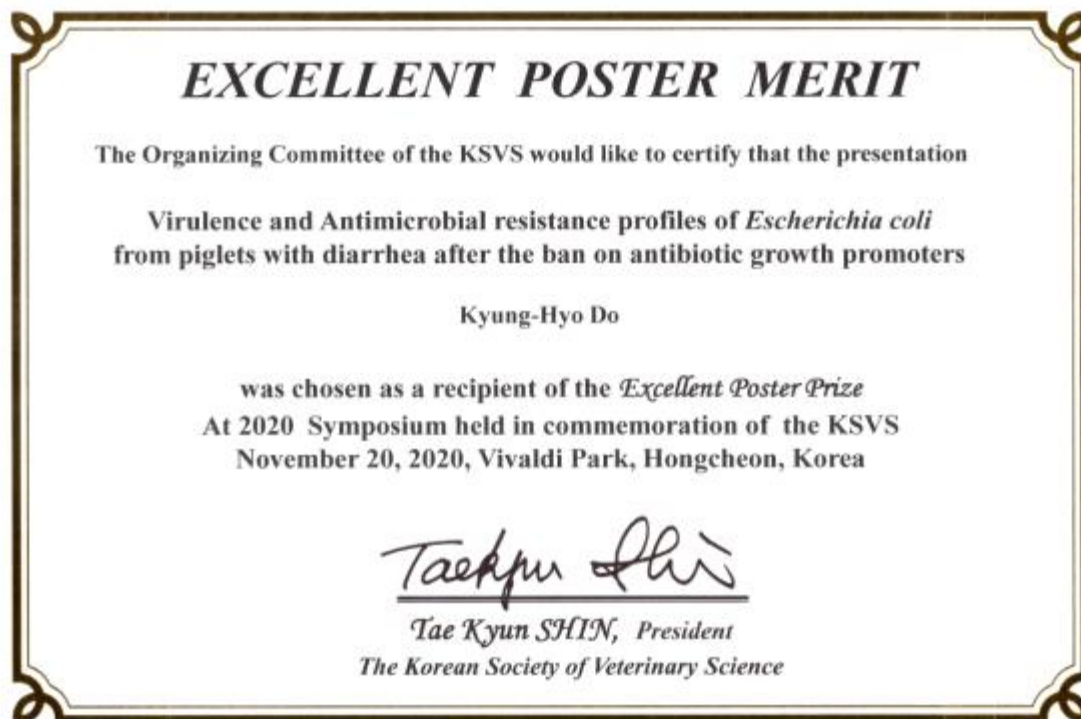
자세한 사항은 [충북대 수의방역대학원 홈페이지](#)에서 확인할 수 있다.



충북대학교



2024년 충북대학교
수의방역대학원 일반전형
석사과정 신입생모집



○ 1-2세부

논문- -The effect of C-C motif chemokine ligand 2 supplementation on *in vitro* maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation



OPEN ACCESS

EDITED BY
Mehdi Hajian,
Royan Institute, Iran

REVIEWED BY
Shiva Rouholahi,
Royan Institute, Iran
Xianrong Xiong,
Southwest Minzu University, China

*CORRESPONDENCE
Eunhye Kim
✉ eunhyekim@gnu.ac.kr
Sang-Hwan Hyun
✉ shhyun@cbu.ac.kr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Animal Reproduction – Theriogenology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 03 January 2023
ACCEPTED 22 February 2023
PUBLISHED 13 March 2023

CITATION
Kim S, Oh D, Choi H, Kim M, Cai L, Jawad A,
Haomiao Z, Lee J, Kim E and Hyun S-H (2023)
The effect of C-C motif chemokine ligand 2
supplementation on *in vitro* maturation of
porcine cumulus-oocyte complexes and
subsequent developmental competence after
parthenogenetic activation.
Front. Vet. Sci. 10:1136705.
doi: 10.3389/fvets.2023.1136705

COPYRIGHT
© 2023 Kim, Oh, Choi, Kim, Cai, Jawad,
Haomiao, Lee, Kim and Hyun. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

The effect of C–C motif chemokine ligand 2 supplementation on *in vitro* maturation of porcine cumulus-oocyte complexes and subsequent developmental competence after parthenogenetic activation

Sohee Kim^{1,2}, Dongjin Oh^{1,2}, Hyerin Choi^{1,2}, Mirae Kim^{1,2},
Lian Cai^{1,2,3}, Ali Jawad^{1,2}, Zheng Haomiao^{1,2}, Joohyeong Lee^{1,2},
Eunhye Kim^{4*} and Sang-Hwan Hyun^{1,2,3*}

¹Laboratory of Veterinary Embryology and Biotechnology, Veterinary Medical Center and College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea, ²Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea, ³Graduate School of Veterinary Science and Protection, Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea, ⁴Laboratory of Molecular Diagnostics and Cell Biology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea

Porcine embryos are used for a variety of applications. However, the maturation rate *in vitro* remains low, and novel *in vitro* maturation (IVM) techniques that facilitate the collection of mature oocytes are necessary. C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) is a key periovulatory chemokine present in cumulus-oocyte complexes (COCs). We aimed to examine the effects of CCL2 supplementation during IVM on oocyte maturation and embryonic development. The CCL2 concentration was significantly higher in porcine follicular fluid (pFF) derived from follicles >8mm in size than in pFF derived from smaller follicles. There was a significant increase in CCL2 mRNA levels in all follicular cells after IVM compared with that before IVM. We analyzed the localization of CCL2 and its receptor, the CCL2 receptor, in follicular cells. During IVM, different concentrations of CCL2 were added to COCs cultured in a maturation medium. After IVM, the group treated with 100 ng/mL CCL2 showed significantly higher metaphase II rates than the control group. All CCL2-treatment groups showed a significant increase in intracellular glutathione levels and a significant decrease in reactive oxygen species levels, compared to the control. In CCs treated with 100 ng/mL CCL2, the mRNA levels of BAX, CASP3, and NPR2 were significantly decreased. Furthermore, the mRNA levels of SOD1, SOD2, and CD44 were significantly increased. In oocytes treated with 10 ng/mL CCL2, mRNA levels of BAX and CASP3 were significantly decreased, whereas, NRF2 and NPM2 were significantly increased. ERK1 exhibited significantly increased mRNA expression in both CCs and oocytes treated with 10 ng/mL CCL2. The protein expression ratio of phosphorylated ERK1/2 to total ERK1/2 was significantly increased in CCs treated with 10 ng/mL CCL2. After parthenogenetic activation, cleavage rates were significantly improved in the 100 ng/mL CCL2 treatment group, and blastocyst formation rates were

P 55

In vitro maturation of the porcine cumulus-oocyte complex supplemented with fibroblast growth factor 7 improves oocyte maturation and early embryonic development

Haomiao Zheng^{1,2}, Sang-Hwan Hyun^{1,2}

¹Institute of Stem Cell & Regenerative Medicine (ISCRM), Chungbuk National University, 1 Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju 28644, Republic of Korea; ²Laboratory of Veterinary Embryology and Biotechnology (VETEMBIO), Veterinary Medical Center and College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 1 Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju 28644, Republic of Korea

In vitro production technology in porcine is considered to be an important technology in agriculture and biomedicine. However, its efficiency in obtaining mature oocytes and embryos *in vitro* is still lower than other species; therefore, research on improving the efficiency of *in vitro* mature oocytes and embryos in porcine is necessary. Fibroblast growth factor-7 (FGF7), also known as keratinocyte growth factor (KGF), is a cytokine that has been shown to be expressed in porcine follicles and granulosa cells. As its effect on maturation and subsequent development of porcine oocytes is not yet clear, this study was designed to investigate it. To investigate the role of FGF7 and its mode of action, the localization of FGF7 and its receptor on porcine ovaries was further verified in this paper. The quality of mature oocytes treated with FGF7 and the subsequent embryonic development were also evaluated. In addition, changes in the mRNA expression of porcine cumulus cells (CCs) and oocytes were analyzed. FGF7 and its receptor were identified by fluorescence immunohistochemistry in porcine ovaries. FGF7 was mainly expressed on theca cells and granulosa cells, and its receptor was only expressed on theca cells. During IVM, the maturation medium was supplemented with different concentrations of FGF7 (0, 1, 10 and 100 ng/ml) to culture porcine cumulus-oocyte complexes (COCs). The results of the experiment showed that FGF7 improved the number and quality of mature oocytes, as evidenced by the higher nuclear maturation rate, increased glutathione levels and reduced reactive oxygen species (ROS) levels as well as increased oocyte diameter in FGF7-treated oocytes. Similar results were found for mRNA expression in FGF7-treated oocytes and cumulus cells, with a notable decrease in pro-apoptotic genes, a significant increase in antioxidant genes and upregulated oocyte secretion factor-related genes. Meanwhile, the mRNA expression levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling pathway and c-kit pathway were remarkably increased in FGF7-treated oocytes, suggesting the mechanism of FGF7 in porcine oocyte maturation. Furthermore, the raised blastocyst rate after Parthenogenetic activation demonstrated the ability of FGF7 to improve oocyte development to the blastocyst stage. The present results of this study suggest that FGF-7 supplementation during IVM can enhance the quality of mature oocytes as well as improve the subsequent development of parthenogenetically-activated embryos.

*This work was supported by grants from the "NRF funded by the Korean Government (2020R1A2C2008276, 2021R1C1C2013954, and 2023E0701017)" and "IPET in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (320005-4)", Republic of Korea.

Key words: IVM, FGF7, KGF, Porcine oocyte

특허출원 - 연구개발 진행된 '우량암소선발을 위한 보정 육종가 및 우량암소 선별지수 계산방법 및 장치'에 대한 특허 출원 완료

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2024.01.04
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2024-0001491 (접수번호 1-1-2024-0013851-53)
(DAS접근코드7FA0)
출원인명칭 (주)터보소프트(1-2010-016684-5)
발명자성명 송제민 현상환 강병철
발명의명칭 돈사 발병 예방, 예측 및 돈사 관리를 위한 수식 Generator

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

저작권- - 연구개발 고도화가 진행 완료된 'ICT(정보 통신 기술) 돈사 관리 시스템 v1.2' 에 대한 프로그램 등록 진행 완료.

제	C-2023-060609	호
---	---------------	---



저작권 등록증

1. 저작물의 제호(명칭)	ICT(정보 통신 기술) 돈사 관리 시스템 v1.2
2. 저작물의 종류	컴퓨터프로그램저작물>응용프로그램
3. 저작자 성명(법인명)	주식회사 터보소프트 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 의로단지길 116 201호
4. 생년월일(법인등록번호)	150111-0123244
5. 창작연월일	2023년11월01일
6. 공표연월일	-
7. 등록연월일	2023년12월15일
8. 등록사항	저작자 : 주식회사 터보소프트, 창작 : 2023.11.01

『저작권법』 제53조에 따라 위와 같이 등록되었음을 증명합니다.

2023년 12월 15일

한국저작권위원회









기 술 이 전 계 약 서



양 도 인 : 충북대학교산학협력단 대표 최상훈

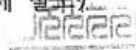
양 수 인 : 티보소프트 대표 송제민

대상기술 : ICT 접목기술 개발을 위한 미경산돈 발정기
행동학적 평가

계 약 일 : 2020년 04월 27일

충북대학교산학협력단

- 기술이전명 : ICT 접목기술 개발을 위한 미경산돈 발정기 행동학적 평가 노하우
- 이전기간 : 2020년 04월 27일 ~ 2021년 02월 28일
- 기술이전책임자: 충북대학교 수의과대학 교수 현상환
- 기술료: 금오백만원(₩ 5,000,000; 부가가치세 별도)



**CONTRACT FOR DEVELOPMENT OF
PORCINE BEHAVIOR ANALYSIS SYSTEM**

This Contract for Development of Porcine Behavior Analysis System (“the Contract”) made the 1st day of December 2023

BETWEEN

COCOONINS INC., a company incorporated in United States of America, (hereinafter referred to “**the 1st Party**” which expression shall, unless repugnant to the context or meaning thereof, mean and include its successors, representatives and permitted assigns) of the one part;

AND

TURBOSOFT INC., a company incorporated in South Korea, (hereinafter referred to “**the 2nd Party**” which expression shall, unless repugnant to the context or meaning thereof, mean and include its successors, representatives and permitted assigns) of the one part;

WHEREAS the 1st Party funds the activity of the 2nd Party to develop Porcine Behavior Analysis System (hereinafter referred as “System”) based on the requirements of the 1st Party.

AND WHEREAS, the 2nd Party is desirous to develop the System and deploy the System to wherever 1st Party indicates under the terms and conditions set forth in the Contract at the price of 40,000 USD (hereinafter referred to as “the Total fees”) which is equivalent to 51,760,000 KRW applying the exchanging rate at 1,294 KRW/USD.

NOW, THEREFORE, IN CONSIDERATION of the **PROMISES** and the **MUTUAL COVENANTS** of the Parties hereto as set forth hereinafter, it is mutually agreed as follows:-

**ARTICLE 1
INTERPRETATION**

- 1.1 In this Contract, unless the context otherwise requires:
- “**Contract**” means this Contract for Development of Porcine Behavior Analysis System.
 - “**Parties**” means the 1st Party and 2nd Party and their successors, representatives and permitted assigns, as the case may be;
 - “**System**” means the Porcine Behavior Analysis System; and
 - “**Total fees**” means contracted price for 2nd Party to engage in the development of the System and the deployment of the System to wherever 1st Party indicates.
 - “**Contractual Period**” means the duration of the Contract set forth in the Contract.

충북대 수의과대학 오동진, 김소희씨, 우수포스터상 수상

A 명찬호 | © 입력 2023.01.25 17:36 | © 수정 2023.01.25 17:38 | 댓글 0



2023 한국줄기세포학회 동계학술대회



(왼쪽부터) 충북대 수의과대학 오동진(박사 2년), 김소희(석사 졸업예정, 이상 지도교수 현상환)

〔동양일보 명찬호 기자〕충북대 수의과대학 대학원생들이 한국줄기세포학회 동계학술대회에서 다수 수상하는 쾌거를 거뒀다.

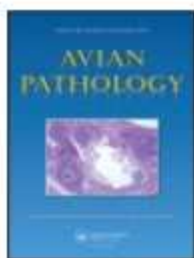


- 일립니
- 편집·
- 30화
- 25화



○ 1-1협동

논문-Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines



Avian Pathology



ISSN: (Print) (Online) journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/cavp20>

Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines

Van Dam Lai , Kyeongcheol Min , Huong Thi Lan Lai & Jongseo Mo

To cite this article: Van Dam Lai , Kyeongcheol Min , Huong Thi Lan Lai & Jongseo Mo (2021): Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines, Avian Pathology, DOI: [10.1080/03079457.2021.1872766](https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1872766)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1872766>



© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



[View supplementary material](#)



Published online: 03 Feb 2021.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 64



[View related articles](#)




[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cavp20>

[붙임 6] 매출확인서

농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	현장중심 문제해결형 방역전문가 양성을 위한 최신의 동물감염병 방역기술 개발			
주관연구기관	충북대학교 산학협력단	참여기관	(주)중앙백신연구소	
연구책임자	강신영	연구기간	2020년 01월 - 2024년 01월(총4년)	
기업 정보	기업 매출 총액 : 39,255,070,194 원			
관련 실적	특허(), 품종(), 소프트웨어(), 디자인(), 상표(), 기타(동물용의약품 출시)			
	명칭(번호) : 포울샷® 아데노 3가(허가번호: 제13-235호)			
	기술실시 명칭 : 해당없음			
해당제품의 매출 실적				
제품명	제품사진	매출액(원)		해당 과제의 매출액 기여율(%)
포울샷® 아데노 3가		국내	161,980,000	48.9
		국외	-	
<p>* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등)</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.</p>				

2024년 1월 15일

연구책임자 : 강 신 영 (서명 또는 인)



제 013 - 235 호

동물용의약품등 제조 수입 품목 허가(신고)증

1. 업 체 명 : (주)중앙백신연구소
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 포울샷 아데노 3가(PoulShot IBH 4/8b/11)
4. 구 분 : 동물용의약품
5. 허 가 조 건 : 재심사 대상: 신청기간 2029.3.31.~ 2029.6.30.
6. 허가(신고)번호 : 제 013 - 235 호
7. 최초 허가(신고) 연 월 일 : 2023.03.31
8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가(신고)합니다.

2023 년 03 월 31 일

농림축산검역본부장



국내 가금 아데노바이러스 3종 다발 ‘교차방어 어려워..3가 백신 필요’

중앙백신연구소, 포울샷 아데노3가 백신 런칭 세미나 개최

등록 : 2023.07.28 06:33:59 수정 : 2023.08.01 11:17:13

윤상준 기자

중앙백신연구소가 26일 대전 호텔CC에서 포울샷® 아데노3가 백신 런칭 세미나를 개최했다.

국내 가금에서 주로 문제를 일으키는 아데노바이러스가 4·8b·11형인데, 혈청형 간 교차방어가 어려워 3가 백신이 필요하다는 점을 강조했다.

이날 중앙백신연구소가 소개한 실험에 따르면 1회 접종으로 증계에서 면역이 유지되고, 모체이행항체를 통한 후대병아리에서의 방어효과도 확인됐다.



모인필 전 충북대 교수 (현 아비넥스트 대표)

국내 다발 가금 아데노바이러스 4·8b·11형

혈청형 간 교차방어 어려워

가금 아데노바이러스(FAdV) 감염증은 육계에서 난계대전염과 복합감염으로 폐사를 일으키는 주요 질병 중 하나다. 특히 전염배설감주머니병(전염성F낭병, IBD, 갑보로)과 복합감염되면 피해가 커질 수 있다.

○ 1-2협동

논문-A Machine Learning Approach Reveals a Microbiota Signature for Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Cattle



RESEARCH ARTICLE



A Machine Learning Approach Reveals a Microbiota Signature for Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Cattle

Sang-Mok Lee,^a Hong-Tae Park,^b Seojoung Park,^a Jun Ho Lee,^b Danil Kim,^c Han Sang Yoo,^b Donghyuk Kim^a

^aSchool of Energy and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea

^bDepartment of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

^cDepartment of Farm Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Sang-Mok Lee and Hong-Tae Park contributed equally to this work. The author order was determined by their equal but graduated contributions for this paper.

ABSTRACT Although *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) has threatened public health and the livestock industry, the current diagnostic tools (e.g., fecal PCR and enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]) for MAP infection have some limitations, such as inconsistent results due to intermittent bacterial shedding or low sensitivity during the early stage of infection. Therefore, this study aimed to develop a novel biomarker focusing on elucidating the gut microbial signature of MAP-positive ruminants, since the clinical signs of MAP infection are closely related to dysbiosis. 16S rRNA-based gut microbial community analysis revealed both a decrease in microbial diversity and the emergence of several distinct taxa following MAP infection. To determine the discriminant taxa diagnostic of MAP infection, machine learning-based feature selection and predictive model construction were applied to taxon abundance data or their transformed derivatives. The selected taxa, such as *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile*, were used to build models using a support vector machine, linear support vector classification, *k*-nearest neighbor, and random forest with 10-fold cross-validation. The receiver operating characteristic-area under the curve (ROC-AUC) analysis of the models revealed their high accuracy, up to approximately 96%. Collectively, taxonomic signatures of cattle gut microbiotas according to MAP infection status could be identified by feature selection tools and applied to establish a predictive model for the infection state.

IMPORTANCE Due to the limitations, such as intermittent bacterial shedding or poor sensitivity, of the current diagnostic tools for Johne's disease, novel biomarkers are urgently needed to aid control of the disease. Here, we explored the fecal microbiota of Johne's disease-affected cattle and tried to discover distinct microbial characteristics which have the potential to be novel noninvasive biomarkers. Through 16S rRNA sequencing and machine learning approaches, a dozen taxa were selected as taxonomic signatures to discriminate the disease state. In addition, when constructing predictive models using relative abundance data of the corresponding taxa, the models showed high accuracy for classification, even including animals with subclinical infection. Thus, our study suggested novel noninvasive microbiological biomarkers that are robustly expressed regardless of subclinical infection and the applicability of machine learning for diagnosis of Johne's disease.

KEYWORDS *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, gut microbiota signature, machine learning-based predictive model, 16S rRNA sequencing, feature selection

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) is an infectious pathogen causing Johne's disease (JD) or paratuberculosis (PTB) in ruminants (1). Animals infected with MAP suffer from chronic enteritis and diarrhea, which causes decreases

Editor Frederik S. S. Kibenge, University of Florida, Edward Rouse

Copyright © 2023 Lee et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Han Sang Yoo, yoohs@mus.ac.kr, or Donghyuk Kim, dhkim@unist.ac.kr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 10 August 2023

Accepted 18 December 2023

Published 19 January 2023

RESEARCH ARTICLE

MicroRNA profiling in bovine serum according to the stage of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection

Sung-Woon Choi^{1,2}, Suji Kim^{1,2}, Hong-Tae Park^{1,3}, Hyun-Eul Park⁴, Jeong-Soo Choi⁵, Han Sang Yoo^{1,2,3*}

1 Department of Infectious Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, **2** BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Center, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, **3** Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, **4** Department of Microbiology, Research Institute of Life Science, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea, **5** Bacterial Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon-si, Republic of Korea

* yoohs@snu.ac.kr



OPEN ACCESS

Citation: Choi S-W, Kim S, Park H-T, Park H-E, Choi J-S, Yoo HS (2021) MicroRNA profiling in bovine serum according to the stage of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. PLOS ONE 16(11): e0259539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259539>

Editor: Yung-Fu Chang, Cornell University, UNITED STATES

Received: September 16, 2021

Accepted: October 20, 2021

Published: November 4, 2021

Copyright: © 2021 Choi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw files and normalized datasets are available from the Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession number GSE166230 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE166230>).

Funding: This work was carried out with the support of the Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food (No. IPET918020-4), Agriculture, Food and Rural Affairs Convergence Technologies Program for Educating Creative Global Leader (No. 320005-4), Ministry of

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of Johne's disease (JD), and it causes diarrhea and weakness in cattle. During a long subclinical stage, infected animals without clinical signs shed pathogens through feces. For this reason, the diagnosis of JD during the subclinical stage is very important. Circulating miRNAs are attracting attention as useful biomarkers in various veterinary diseases because of their expression changes depending on the state of the disease. Based on current knowledge, circulating miRNAs extracted from bovine serum were used to develop a diagnostic tool for JD. In this study, the animals were divided into 4 groups according to fecal shedding, the presence of antibodies, and clinical signs. Gene expression was analyzed by performing miRNA sequencing for each group, and it was identified that the miRNA expression changed more as the MAP infection progressed. The eight miRNAs that were differentially expressed in all infected groups were selected as biomarker candidates based on their significant differences compared to the control group. These biomarker candidates were validated by qRT-PCR. Considering the sequencing data, two upregulated miRNAs and two downregulated miRNAs showed the same trend in the validation results. Network analysis was also conducted and the results showed that mRNAs (*IL-10*, *TGF-β1*) associated with regulatory T cells were predicted to be activated in the subclinical stage. Taken together, our data suggest that two miRNAs (bta-miR-374b, bta-miR-2887) may play major roles in the immune response to MAP infection during the subclinical stage.

Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis (PTB) or Johne's disease (JD), which is a chronic infectious disease characterized by persistent

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2023.12.29
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2023-0196361 (접수번호 1-1-2023-1475397-27)
(DAS접근코드F14C)
출원인명칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)
대리인성명 특허법인 정진(9-2022-100081-7)
발명자성명 김단일 권혁준 김은경 손승은 안선민
발명의명칭 클로스트리듬 퍼프린젠스 분자 진단방법

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.wipo.go.kr> 지식재산제도

○ 3-1세부
인력양성-석사졸업

문서확인번호 □ XD06-CE49-A17F-D39D □



석사학위수여증명서

성명	전종수 (Jun Jongsoo)
생년월일	1996년 7월 6일
소속	일반대학원 석사과정 수의학과 수의병리학전공
입학일자	2022년 3월 1일
수여일자	2024년 2월 22일
학위증서번호	제 20386호
학위등록번호	건국대 2023석 0208
학위명	수의학 석사

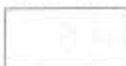
위의 사실을 증명함.

2024년 02월 22일

건국대학교 교무



*본 증명서는 인화용으로 발급된 증명서로서, 영인청문서(www.ahninjeon.com)에서 확인확인 문서번호를 통해 정본대조가 가능(당일 주 30일간). *제출은 인터넷으로 증명서 발급.



석사학위수여증명서

성명	최안국(Choi Ankook)
생년월일	1996년 9월 26일
소속	일반대학원 석사과정 수의학과 수의병리학전공
입학일자	2022년 3월 1일
수여일자	2024년 2월 22일
학위증서번호	재 20367호
학위등록번호	건국대 2023석 0209
학위명	수의학 석사

위의 사실을 증명함.

2024년 02월 22일

건국대학교 교무



*본 증명서는 인터넷으로 발급된 증명서로서, 확인문서(www.vchriswon.com)에서 원본확인 문서번호를 통해 원본대조가 가능(발급 후 90일간). *제출유증 없으므로 출력물 변경.





석사학위수여증명서

성명	장성원 (JUNG SUNGWON)
생년월일	2000년 2월 4일
소속	일반대학원 석사과정 수의학과 수의미생물학및천연염병학전공
입학일자	2022년 3월 1일
수여일자	2024년 2월 22일
학위증서번호	제 20361호
학위등록번호	건국대 2023석 0203
학위명	수의학 석사

위의 사실을 증명함.

2024년 03월 12일

건국대학교 교무



본 PDF증명서는 타임스탬프(시점확인도장)와 전자서명을 통해 원본 효력을 가지는 전자증명서로서, 출력물은 사본입니다. www.webinwon.com에서 위변조 여부를 검증하시기 바랍니다. (유효기간은 발급일로부터 180일)(Adobe Acrobat Reader 권장)

재직증명서

제(20240306-001)

성명	전중수	주민번호	
주소	대전광역시 우		
소속	연구개발팀	직위	인턴
재직기간	2024-02-05 - 현재		
제출처	주인센터		

용도

전입신고

상기자는 당사에 재직증임을 증명함.

2024년 3월 6일

(주)중앙백신연구소

대표이사 윤인중



재직증명서

제(20240311-002)

성명	최안국	주민번호	
주소	대전광역시 ...		
소속	연구개발팀	직위	연구원
재직기간	2024-02-05 - 현재		
제출처	건국대학교		

용도

학교 제출

상기자는 당사에 재직증임을 증명함.

2024년 3월 11일

(주)중앙백신연구소

대표이사 윤인중



○ 3-2세부
특허출원

23. 8. 24. 오후 1:34

특허로
관인생략

출원번호통지서

출원일자 2023.08.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2023-0111100 (접수번호 1-1-2023-0932972-90)
(DAS접근코드9302)
출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)
발명자성명 이상원 이종복 박승용 최인수 신현진
발명의명칭 살모넬라 엔테리티디스 온도감수성 변이주 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 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가
까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하
여야 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.wipo.go.kr>-지식재산제도

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.11.23
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1071742)
출원번호 10-2022-0158725 (접수번호 1-1-2022-1255286-29)
(DAS접근코드970E)
출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명 특허법인이클리어(9-2016-100061-5)
발명자성명 이상원 이종복 송창선 박승용 최인수
발명의명칭 살모넬라 갈리나룸 9 계통 유래주 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 가금티푸스 원인균
감별 방법





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 가
까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하
여 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

Article

Characteristics of a Temperature-Sensitive Mutant Strain of *Salmonella* Enteritidis and Its Potential as a Live Vaccine Candidate

Hyunjin Shin , Tae-Min La, Hong-Jae Lee , Taesoo Kim, Seung-un Song, Gyu-Hyung Park, In-Soo Choi, Seung-Yong Park, Joong-Bok Lee  and Sang-Won Lee  *

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea

* Correspondence: odssey@kku.ac.kr

Simple Summary: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis can cause human salmonellosis; however, its main carrier, poultry, does not show any clinical symptoms. In this study, we evaluated the potential of a mutant *Salmonella* Enteritidis strain as a vaccine candidate. Compared to the wild-type *Salmonella* Enteritidis, the vaccine candidate *Salmonella* Enteritidis strain was more attenuated. Moreover, single nucleotide polymorphism analysis revealed that genetic changes in the vaccine candidate strain corresponded with its phenotypes. Thus, the *Salmonella* Enteritidis strain constructed in our laboratory might be valuable in developing a novel live-attenuated vaccine against *Salmonella* Enteritidis.

Abstract: *Salmonella* Enteritidis is a common foodborne pathogen transmitted through poultry products, which are its main carriers. Poultry are vaccinated against *Salmonella* Enteritidis in many countries, despite the absence of clinical symptoms, using commercially available live-attenuated vaccines. We previously constructed a highly attenuated temperature-sensitive (ts) *Salmonella* Enteritidis mutant, 2S-G10. In the present study, we describe the construction and attenuation-associated characteristics of 2S-G10. We infected 1-day-old chicks with 2S-G10 and the parental strains to evaluate the attenuation. One week after infection, 2S-G10 was not detected in the liver, cecum, or cecal tonsil tissues of the orally inoculated chicks, contrary to the parental strain. This indicates that 2S-G10 was highly attenuated when compared to the parental strain. In vitro experiments revealed the inability of 2S-G10 to grow at the normal body temperature of chickens and invade chicken liver epithelial cells. Moreover, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis between the complete genome sequence of 2S-G10 and its parental strain revealed SNPs in *bcsE*, *recG*, *rfaF*, and *pepD_1* genes, which are involved in epithelial cell invasion and persistence in host systems, growth, lipopolysaccharide core biosynthesis, and cellular survival under heat stress, respectively. These potential characteristics are consistent with the findings of in vitro experiments. Conclusively, chemical treatment-induced random genetic mutations highly attenuated 2S-G10, implying its potential to be developed as a novel live-attenuated vaccine against *Salmonella* Enteritidis.

Keywords: chickens; live-attenuated vaccine; safety; *Salmonella* Enteritidis; single nucleotide polymorphism; temperature-sensitive



Citation: Shin, H.; La, T.-M.; Lee, H.-J.; Kim, T.; Song, S.-u.; Park, G.-H.; Choi, I.-S.; Park, S.-Y.; Lee, J.-B.; Lee, S.-W. Characteristics of a Temperature-Sensitive Mutant Strain of *Salmonella* Enteritidis and Its Potential as a Live Vaccine Candidate. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 313. <https://doi.org/10.3390/vetsci10050313>

Academic Editor: Dabab Habib

Received: 15 March 2023

Revised: 19 April 2023

Accepted: 24 April 2023

Published: 25 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Salmonella enterica serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) is one of the most common *Salmonella* serotypes causing foodborne infections in humans worldwide [1]. Human salmonellosis is frequently caused by the consumption of *Salmonella*-contaminated foods, particularly poultry products and eggs [1,2]. Since poultry products and eggs have been identified as major sources of *S. Enteritidis* in food consumed by humans worldwide, there is an urgent need for efficient programs to control *Salmonella* infections in poultry [3]. The currently available commercial vaccines for poultry are based on live-attenuated *S. Enteritidis* strains, such as AviPro *Salmonella* Vac E (Lohmann Animal

Article

Evaluation of Immune Responses and Protective Efficacy of a Novel Live Attenuated *Salmonella* Enteritidis Vaccine Candidate in Chickens

Hyunjin Shin , Tae-Min La, Hong-Jae Lee, Taesoo Kim, Seung-un Song, Eunjin Park, Gyu-Hyung Park, In-Soo Choi, Seung-Yong Park, Joong-Bok Lee  and Sang-Won Lee 

College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

* Correspondence: odssey@kku.ac.kr



Citation: Shin, H.; La, T.-M.; Lee, H.-J.; Kim, T.; Song, S.-u.; Park, E.; Park, G.-H.; Choi, I.-S.; Park, S.-Y.; Lee, J.-B.; et al. Evaluation of Immune Responses and Protective Efficacy of a Novel Live Attenuated *Salmonella* Enteritidis Vaccine Candidate in Chickens. *Vaccines* **2022**, *10*, 1405. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091405>

Academic Editor: Ralph A. Tripp

Received: 29 July 2022

Accepted: 25 August 2022

Published: 27 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: An ideal vaccine for controlling *Salmonella* infection in chicken flocks should be safe, inducing both humoral and cellular immunity. Live attenuated vaccines against *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) have been used as a potential control method of *Salmonella* infection in the poultry industry. However, live attenuated vaccines can persistently infect poultry for long periods and can become virulent revertant strains. In this study, we assessed the immune responses and protective efficacy of a temperature-sensitive attenuated *S. Enteritidis* mutant as a potential vaccine candidate. In addition, we evaluated the combined vaccine administration methods to maximize both humoral and cellular immune responses in chickens induced by the vaccine candidate. Immune responses and protective efficacy were compared between the Oral/IM group, vaccinated using one oral dose at four weeks old and a booster intramuscular dose at seven weeks old, and the IM/Oral group, vaccinated using one intramuscular dose at four weeks old and a booster oral dose at seven weeks old. The Oral/IM group showed stronger immune responses than those of the IM/Oral group. Splens from the Oral/IM group showed a promising tendency of reduction of challenged *Salmonella* compared with those of other groups. Overall, the results indicated that the *S. Enteritidis* mutant strain is a promising live attenuated vaccine candidate with good efficacy.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; live attenuated vaccine; immune response; protective efficacy

1. Introduction

A significant proportion of human *Salmonella* infections are caused by the consumption of raw or undercooked poultry products [1,2]. Notably, *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) is one of the most frequently reported serotypes in human *Salmonella* infections [3]. This public health concern can result in significant economic losses and can be aggravated by the antimicrobial resistances in *Salmonella* [2,4,5]. Therefore, controlling the contamination of poultry products is important for reducing salmonellosis. In addition to good hygiene and biosecurity practices, several methods have been employed to reduce *Salmonella* infections in poultry farms, such as the use of food additives, selection of chicken strains that are genetically resistant to *Salmonella* infections, and the development of *Salmonella* vaccines [6–9]. Particularly, live attenuated vaccines against *S. Enteritidis* have proven efficacy in poultry flocks [10]. Live attenuated vaccines are easy to administer and are more effective than inactivated bacterin vaccines, as they induce strong protective immunity [11,12]. However, live attenuated vaccines can persist for long periods in poultry, and high risk is associated with reversion of the vaccine to a virulent strain [13]. Therefore, the development of a safe and immunogenic strain is the biggest challenge in developing live *Salmonella* vaccines [14].

We previously developed a live attenuated *Salmonella* strain vaccine candidates using *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (not published). In this study, we evaluated its immunogenicity and protective efficacy in chickens.

논문-Inhibition of endocytosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by rotterlin and its potential prophylactic administration in piglets

Antiviral Research 195 (2021) 105191



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral



Inhibition of endocytosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by rotterlin and its potential prophylactic administration in piglets

Yeong-Lim Kang^a, Changin Oh^b, So-Hyun Ahn^a, Jong-Chul Choi^a, Hwi-Yeon Choi^a, Sang-Won Lee^a, In-Soo Choi^a, Chang-Seon Song^a, Joong-Bok Lee^a, Seung-Yong Park^{a,*}

^a Laboratory of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, 05029, Republic of Korea

^b Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, 06520-8005, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein kinase C
Rotterlin
Liposome
PRRSV
Antivirals

ABSTRACT

Owing to several limitations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) control procedures, the importance of antiviral agents is increasing; however, limited studies have been done on the development of anti-PRRSV agents. Herein, we explored the antiviral effect and mechanism of rotterlin against PRRSV. We demonstrated that treatment of rotterlin at an early stage of PRRSV infection significantly inhibited the viral replication. PRRSV infection induced protein kinase C- δ phosphorylation, which was specifically downregulated by rotterlin. The treatment of rotterlin led to disrupting the PRRSV entry pathway by blocking endocytosis of the virions. Further, to evaluate the anti-PRRSV effect of the rotterlin *in vivo*, we administrated rotterlin loaded liposome to pigs infected with PRRSV LMY or FL12 strain. The treatment of rotterlin-liposome reduced the blood viral load, interstitial pneumonia and clinical scores compared to untreated pigs. These results provide an evidence of anti-PRRSV effect of rotterlin *in vitro* via inhibiting PRRSV internalization and *in vivo*, all of which strongly suggest the applicability of rotterlin as a potential PRRSV prophylactic treatment.

1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a causative agent of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), an important infectious disease in pigs, causing severe reproductive failure in pregnant sows and interstitial pneumonia in young piglets by compromising the function of pulmonary macrophages (Dotterer et al., 1994; Christianson et al., 1992; Lager et al., 1997; Nielsen et al., 2002). The control of PRRS is challenging owing to persistent and subclinical infections and insufficient antibody response to completely block viral re-infection, despite the vaccination (Moutaner-Tarbes et al., 2019; Renukaradhya et al., 2015). Therefore, effective control methods and antiviral drugs for PRRSV are needed, which are poorly developed due to their economic costs (Du et al., 2017).

Rotterlin, a polyphenolic ketone compound from the Indian Kamala tree (*Mallotus philippensis*), is widely used as a PKC δ specific inhibitor (Contreras et al., 2012; Gschwendt et al., 1994; Zhao et al., 2014). Rotterlin has been traditionally used to treat tapeworm, scabies, and herpetic ringworm infections in India for several centuries (Mukerji and

Bhaduri, 1947), suggesting its historically proven safety. Interestingly, several previous studies have reported the antiviral effect of rotterlin for various viruses such as rabies, influenza, human immunodeficiency virus, and PRRSV (Contreras et al., 2012; Hoffmann et al., 2008; Lama et al., 2019; Zhao et al., 2014). In a previous PRRSV study, pre-treatment of rotterlin significantly reduced the viral RNA synthesis and titer, but a detailed understanding of its antiviral effect and mechanism remained unclear. Hence, in this study, we demonstrated the antiviral activity of rotterlin against PRRSV *in vitro* and *in vivo*.

2. Methods

2.1. Viruses

PRRSV FL12 used in this study was rescued from the pCMV-FL12/24 plasmid (Shahir et al., 2016) using a Viafect transfection agent (Promega, USA), which was kindly provided by Professor Won-II Kim. PRRSV LMY was isolated by the Animal and Plant Quarantine Agency from a Korean farm with clinical problems (Cha et al., 2006).

* Corresponding author. Laboratory of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Republic of Korea.

E-mail address: psuryo@konkuk.ac.kr (S.-Y. Park).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105191>

Received 15 May 2021; Received in revised form 27 August 2021; Accepted 18 October 2021

Available online 20 October 2021

0166-3542/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



Avian Reoviruses From Wild Birds Exhibit Pathogenicity to Specific Pathogen Free Chickens by Footpad Route

Yu-Ri Choi[†], Sang-Won Kim[†], Ke Shang, Jong-Yeol Park, Jun-feng Zhang, Hyung-Kwan Jang, Bai Wei, Se-Yeoun Cha* and Min Kang*

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Xiaorong Zhang,
Yangzhou University, China

Reviewed by:

Chengcheng Zhang,
Yangzhou University, China
Andrea Josefine Ayala,
Yale University, United States

*Correspondence:

Min Kang

Se-Yeoun Cha

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Veterinary Experimental and
Diagnostic Pathology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 29 December 2021

Accepted: 31 January 2022

Published: 24 February 2022

Citation:

Choi Y-R, Kim S-W, Shang K,
Park J-Y, Zhang J-F, Jang H-K, Wei B,
Cha S-Y and Kang M (2022) Avian
Reoviruses From Wild Birds Exhibit
Pathogenicity to Specific Pathogen
Free Chickens by Footpad Route.
Front. Vet. Sci. 9:844903.
doi: 10.3389/fvets.2022.844903

Avian reoviruses (ARVs) are ubiquitous in domestic poultry with 80% of them being non-pathogenic and they are frequently found in clinically healthy birds. ARVs have also been known to be the etiological agents of viral arthritis (VA), tenosynovitis, myocarditis, runting-stunting syndrome (RSS), and respiratory and enteric disease in chickens. Significant economic losses during the process of poultry husbandry are due, in part, to unmitigated ARV infections throughout the poultry industry. Recently, many isolates shared genetic similarities between those recovered from wild birds and those recovered from poultry. One explanation may be that there is a degree of spillover and spillback of ARVs between the two groups. However, studies on the role of wild birds in the epidemiology and pathogenicity of ARVs are insufficient. Here, we describe the pathogenicity in specific pathogen-free (SPF) chickens of ARV originating from wild birds. The challenge experiment was conducted in six groups including a negative control group, a positive control group (reference strain of S1133), and four groups (A15-157, A18-13, A18-205, A19-106) infected with ARVs from wild birds. The 7-day-old SPF chickens were inoculated with $10^{6.0}$ TCID₅₀ ARV to evaluate the clinical signs, changes in weight gain, gross lesions, histological changes, virus replication, and serum antibody levels. The peak of clinical signs was from 3 to 5 days post infection (dpi). In addition, the death of one chicken was found in the group infected with the A18-13 isolate. Reduced body weight was also found in chickens infected with ARVs from wild birds compared to the negative control group. All the ARVs infection groups showed noticeable swelling of the footpad. In addition, ARVs were detected in the bursa, tendon, and hock joint by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in all infected groups at 5 and 15 dpi. Histopathological observations revealed acute inflammatory responses on the synovium covering the joint surfaces (arthritis) and tendon sheaths (tenosynovitis), as well as bursa atrophy and lymphocyte depletion. The analysis of the humoral response was performed by ELISA assay, and chickens infected with ARVs showed seroconverted. In conclusion, this study described the typical severe disease of acute VA and tenosynovitis in SPF chickens infected with ARVs derived from wild birds. This study confirmed the pathogenicity of ARVs infection in SPF chickens for the first time, and these results enrich our understanding of the pathogenicity of ARVs derived from wild birds.

Keywords: avian reovirus, pathogenicity, non-adaptation, wild bird, carrier, risk, chicken

학술발표-Experimental co-infection of antigenic variant infectious bursal disease virus and fowl adenovirus serotype 8b in specific pathogen free chickens_대한수의학회 추계학술대회_장형관,박종열



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, 비교의학질환연구센터(서울대 SRC), 서울대학교 수의과대학 BK21 FOUR 미래수의학선도교육연구단, 진북대학교, 생체안전성연구소, 중검연구소지명사업단, 제주대학교 수의과대학연구소, 충남대학교 수의과대학 동물의과대학연구소, 재난형 동물감염병 중점연구소, 충북대학교 반려동물중개 의학임센터, 대한골반수의사회, 대한수의사회, 한국동물매개심리치료학회, 한국예방수의학회, 한국동물보건학회, 한국말임상수의사회, 한국수의생리학협회의, 한국수의역리특성학회의, 한국수의태부학회, 한국수의핵의학연구회, 한국야생동물센터협의회
- 후 원 : 제주특별자치도, 한국과학기술단체총연합회, 한국마사회, 배령거인협회(동물약품), 큐바이오노트, 주식회사 티스텔, ㈜한국농식품생명과학협회
- 협 찬 : 씨에이치디, 바이오노트, (사)제주컨벤션뷰로, FEEL 컨설팅, 나노씨엠에스, 로깅헬스케어, ㈜이코바이오에드, 주식회사 티스텔, ㈜옵토레인, ㈜제트바이오텍, 유카브, 티셀바이오

사 단 법 인 대 한 수 의 학 회

The Korean Society of Veterinary Science

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



문서확인번호 : 1675-7415-4209-2489



건강보험자격득실확인서				
가입자	성명	주민등록번호		
		백진엽	930223-1*****	
자격득실확인내역				
NO	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	전북대학교산학협력 단 전북동물의료센터	2023-02-01	
2	지역세대주		2023-01-01	2023-02-01
3	직장피부양자	(유)진보공조	2022-04-26	2023-01-01
4	직장가입자	국군외무학교	2019-04-26	2022-04-26
5	직장피부양자	(유)진보공조	2014-12-16	2019-04-26
6	직장가입자	브이이티장이들	2014-09-15	2014-12-16
7	직장피부양자	(유)진보공조	2001-07-01	2014-09-15
8	지역세대원		1995-02-12	2001-07-01
9	직장피부양자	(주)엘에스	1993-02-23	1995-02-12

◆본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 정부24(gov.kr)의 인터넷발급문서진위확인 메뉴를 통해 위·변조 여부를 확인할 수 있습니다.
 (발급일로부터 90일까지) 또한 문서하단의 바코드로도 진위확인(정부24 앱 또는 스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.





NOTE

Public Health

Isolation of multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium bovis* from a dog in KoreaHo-Seong CHO¹⁾, Ui-Soo CHOI¹⁾, Yeonsu OH^{2)*}¹⁾College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea²⁾College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon, Republic of Korea*J. Vet. Med. Sci.*
84(10): 1358-1362, 2022
doi: 10.1292/jvms.21-0347Received: 15 June 2021
Accepted: 22 July 2022
Advanced Epub:
2 August 2022**ABSTRACT.** A 3-year-old female Miniature Schnauzer dog with a week-long history of generalized intention tremor and progressive weight loss for several months was admitted. Mild anemia, fever, splenomegaly, aseptic cerebral meningitis and systemic lymph nodes enlargement were examined through erythrogram, ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging. *Mycobacterium bovis* was identified via molecular microbiology having the same molecular type as that of isolates from a cattle farm previously identified. However, the dog was raised in a city. The *M. bovis* had multidrug resistance (MDR)-bearing mutations in both *katG* and *rhoB* genes toward first-line antibiotics. To the best of our knowledge, this is the first report describing an MDR *M. bovis* infection of a dog in Korea.**KEYWORDS:** BCG-vaccinated, canine tuberculosis, multi-drug resistant, *Mycobacterium bovis*, one health

Tuberculosis (TB) remains one of the leading devastating infections globally, claiming millions of lives every year [33]. Despite unquestionable progress in the fight against human and bovine TB, human TB is still very prevalent in certain areas, including Middle Africa and Southeast Asia, areas with dense populations and poor social conditions [18]. Although, *Mycobacterium (M.) tuberculosis* is recognized as the primary cause of human TB worldwide, *M. bovis* has become the most common cause of zoonotic TB globally. In 2019, an estimated 140,000 (1.4%, range 69,800-235,000) new cases of zoonotic TB occurred globally, and of those cases, approximately 11,000 (8.1%, range 4,470-21,000) resulted in death [33].

TB in dogs and cats is commonly reported in BCG non-universal-vaccinated countries, such as the US, UK and other European countries [18, 22]. Meanwhile, cases of tuberculosis in companion animals are rarely reported in general BCG vaccinated countries [26] including Korea. In Korea, many TB cases have been reported only in farm animals, however, this is the first companion animal mycobacteriosis by *M. bovis*. This could be explained by the fact that routine diagnostics in veterinary clinics do not cover testing for TB [12]. TB in animals is classified as a category B in European countries [17], list B by OIE [23] and FAO [10] and class II legal infectious disease in Korea. Livestock animals diagnosed with TB are culled with compensation. However, in case of companion animals being diagnosed with TB, there is no mandated course of action and/or standardized measure. Treatment is not often recommended for companion animals, rather euthanasia should be considered for affected companion animals in close contact with people due to public health concerns.

A 3-year-old female Miniature Schnauzer dog with a week-long history of generalized tremor and progressive weight loss for several months was admitted to a veterinary hospital in Korea. Upon neurological examination, the dog showed generalized intention tremor, but cranial and spinal nerve reflexes were unremarkable. All superficial lymph nodes (LN) were enlarged on physical examination. This LN enlargement developed a year prior to admission, and they recently increased in size, according to the owner. The dog was alert and vital signs were stable. An erythrogram revealed mild anemia (HCT 30.1%; reference range 37.0-55.0%) and thrombocytopenia (PLT $85 \times 10^3/\mu\text{L}$; reference range $175-500 \times 10^3/\mu\text{L}$). The dog's blood biochemistry profiles were within normal limits. Ultrasonography and computed tomography revealed splenomegaly and systemic LN enlargement, and mild high signals of cerebral meninges, not distinguishable from normal variation, were noted on magnetic resonance imaging (MRI). The results of cerebrospinal fluid examination were unremarkable. The dog was hospitalized at the intensive care unit and treated with ciprofloxacin, doxycycline and rifampin for mycobacteriosis, and prednisolone, methocarbamol and zonisamide for aseptic meningitis which was diagnosed tentatively, since the next day of presentation. The intensity of tremor was gradually decreased. Despite of treatments, its overall condition was rapidly deteriorated, and the dog was euthanized 4 days after presentation.

*Correspondence to: Oh Y.-y
University, Chuncheon 24341, Republic of Korea
©2022 The Japanese Society of Veterinary Science

College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No-Derivatives (by-nc-nd) License. (CC-BY-NC-ND 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



계 출 용 도 :
계 출 처 : 기타계출용

발 급 일 : 2021/12/01
유 효 기 간 : 2022/03/01

제 2021-116243 호

학 위 수 여 증 명 서

성 명	배다운
생 년 일	1992년 7월 7일
대 학 원	대학원 석사과정
학 과	수의학과
입 학 년 월 일	2019년 9월 2일
학 위 수 여 년 월 일	2021년 8월 20일
학 위 명	수의학석사
학 위 등 록 번 호	전북대 2020(석)0627
주 문 제 목	국내 개와 고양이에서의 SARS-CoV-2에 대한 항원 및 항체 검출률 조사

위의 사실을 증명합니다.

2021년 12월 1일

전 북 대 학 교 총 장



* 유) 54896 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 전북대학교 학사관리과 (063) 270-2094
본 증명서는 전자증명서(파일)이므로 타임스탬프 및 전자서명이 없는 증명서는 원조로 간주되며 파일 이외의 출력물은 사본입니다.

(INTERNET NO) I11254304101

본 증명서는 전자증명서(PDF파일)로 발급되었습니다. 전자증명서는 출력시 출력물은 사본으로 인정됩니다.
전자증명서 확인용 전용뷰어가 아닌 경우 진본 여부 및 전자서명을 확인 할 수 없으며 진본여부가 표시되지 않습니다.
전자증명서 확인용 전용뷰어는 www.certpia.com/VeDown 에서 다운 받을 수 있습니다.

특허-증식성 회장염 감염 돼지로부터 분리된 신규 로소니아 인트라셀룰라리스 균주 및 이를 포함 하는 돼지 증식성 회장염 예방용 백신 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.10.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2022-0136146 (접수번호 1-1-2022-1110987-16)
(DAS접근코드CB92)
출원인명칭 전북대학교산학협력단(2-2003-044369-9) 외 2명
대리인성명 특허법인태백(9-2008-100101-3)
발명자성명 조호성 서병주 이소민 문성현 탁동섭 오연수 김정한
발명의명칭 증식성 회장염 감염 돼지로부터 분리된 신규 로소니아 인트라셀룰라리스 균주 및 이를 포함 하는 돼지 증식성 회장염 예방용 백신 조성물

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☎ 1544-8080에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

○ 2-3세부
 교육지도-제2차 렘피스킨병 전문가 협의회 및 교육

창특가설은 단호하게 청렴실천은 당당하게



농림축산식품부

수신 수신자 참조
 (경유)

제목 제2차 렘피스킨병 전문가 협의회 개최 알림

1. 관련 : 구제역방역과-4451(2022.7.1)호
2. 소 렘피스킨병(LSD) 국내 유입 대비를 위한 제2차 렘피스킨병 전문가 협의회를 다음과 같이 개최하오니 대상자는 참석하여 주시기 바랍니다.

가. 일시 및 방법 : '22.8.8(월) 15:00~16:35, 온나라 영상회의(외부망)
 * 회의명 및 접속방법은 추후 안내 예정

나. 참석대상 : 농식품부(구제역방역과장 주재), 농림축산검역본부, 질병관리청, 지자체(경기, 강원, 전남, 전북, 경북), 관련 단체 및 민간전문가 등(불임 참조)
 * 인사이동시 후임자 참석 협조, 회의수당 지급 협조(방역지원본부)

다. 회의내용 : 가축방역심의회(가방심) 결과 공유, 렘피스킨병 해외 방역사례 소개(연구용역 중간보고) 등

붙임 1. 제2차 렘피스킨병 전문가 협의회 개요 1부. 끝.

농림축산식품부장관

수신자 농림축산검역본부장(방역감시과장), 농림축산검역본부장(역학조사과장), 농림축산검역본부장(동물약품평가과장), 농림축산검역본부장(해외진명병과장), 질병관리청장(애개체분석과장), 국립축산과학원장(가축질병방역과장), 경기도지사(동물방역위생과장), 강원도지사(동물방역과장), 신리북도지사(동물방역과장), 진리남도지사(동물방역과장), 경상북도지사(동물방역과장), 강원대학교총장(수의학과장), 경북대학교총장(자연과학대학장), 경북대학교총장(수의과대학장), 경상대학교 수의대 이칭희 교수, 전북대학교 유명조 교수, 가축위생방역지원본부장, 전국한우협회 김영원 국장, 한국농육우협회 한지터 본부장, 농협경제지주 김명국 국장, 소임상수의사회 백영철

주무관	문송민	서기관	신민섭	구제역방역과장 신경희, 유재형
협조자				
시행	구제역방역과-6078			접수



Original Research Paper

Anti-Inflammatory Effects of *Aralia elata* Extract Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice and Raw 264.7 Macrophage Cells Exposed to Lipopolysaccharide: First Report

Natural Product Communications
Volume 17(9): 1–11
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/19345783221126047
journals.sagepub.com/home/npc



Euiyong Lee^{1*}, Se-Won Lee^{2*}, Gareeballah Osman Adam^{4,5}, Yeo-Jin Yoo¹,
Ha-Young Shin¹, Dongchoon Ahn¹, Tae-Hu Jang², Byung-Taek Oh²,
Byung-Yong Park¹, In-Shik Kim¹, Seung Hyun Lee¹, Jeong Ho Lee³
and Hyun-Jin Tae¹

Abstract

Aralia elata (AE) is an anti-inflammatory, polyphenolic containing medicinal plant. However, little is known about AE and its application to ulcerative colitis (UC). This study aimed to confirm AE extract's antioxidant and anti-inflammatory effects *in vivo* and *in vitro*. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by measuring total polyphenol and flavonoid content in AE extract. AE extract (10 000 mg/L) contained 186.8 mg GAE/g polyphenol and 81.9 mg QE/g flavonoid. Mice were divided into 6 groups, including control, which received normal saline, and treatment groups, which received dextran sodium sulfate (DSS) with or without AE extract (250, 500, and 1000 mg/kg). RAW 264.7 macrophage cells were divided into 2 groups: control and treatment. RAW 264.7 macrophage cells treated with sterile double distilled water, 1 mg/L lipopolysaccharide (LPS), and AE extracts (25, 50, 75, 100 µg/mL) were used to assess the cytotoxicity and anti-inflammatory activity. High-performance liquid chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, and histology were employed to analyze the AE extract contents, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6, as oxidative stress markers. In addition, the disease activity index (DAI) and cytotoxicity were determined in mice and cells, respectively. High-performance liquid chromatography analysis revealed that AE extract is rich in chlorogenic acid (96 \pm 0.01 mg/g). DSS increased the DAI and levels of TNF- α , IL-1 β , and immune cell infiltration compared with those of the control animals. Furthermore, LPS eventually reduced cell viability and increased the levels of NO, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in contrast to control cells. After treatment, a noticeable reduction was observed in the levels of DAI, NO, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 compared to those without AE treatments. Overall, AE extract is safe and had anti-inflammatory properties. Therefore, AE extract can be considered a potential pre-treatment supplement for UC.

Keywords

Aralia elata, inflammatory bowel disease, polyphenols, TNF- α , ulcerative colitis

Received: May 16th, 2022; Accepted: August 25th, 2022.

¹College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Transplantation, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

²Division of Biotechnology, Advanced Institute of Environment and Bioscience, College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea

³Surchang Research Institute of Health and Longevity, Sandang-gun, Republic of Korea

⁴Department of Veterinary Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Sudan University of Science and Technology, Khartoum, Sudan

⁵Integrated Omics Institute, Wookwang University, Iksan, Republic of Korea

*The first two authors contributed equally to this work.

Corresponding Authors:

Hyun-Jin Tae, Department of Veterinary Medicine and Institute of Animal Transplantation, Jeonbuk National University, 79 Gubong-ro, Iksan, Jeollabuk-do 54606, Republic of Korea.



문서확인번호 : 1683-0244-9172-9495



건강보험자격득실확인서				
가입자	성명	주민등록번호		
	권진경	950926-2*****		
자격득실확인내역				
NO	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	24시The케어동물의료센터	2023-03-15	
2	지역세대주		2023-03-09	2023-03-15
3	지역세대원		2022-12-01	2023-03-09
4	직장피부양자	제주시청	2020-12-01	2022-12-01
5	직장피부양자	한국마사회	1995-09-26	2020-12-01
건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.				
2023년 05월 02일				
국민건강보험공단이사장				
-직인생략-				

※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
 ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
 ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용으로 다른 용도(재직증명서, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.

◆본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 정부24(gov.kr)의 인터넷발급문서진위확인 메뉴를 통해 위·변조 여부를 확인할 수 있습니다. (발급일로부터 90일까지) 또한 문서하단의 바코드도 진위확인(정부24 앱 또는 스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.



관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.10.31
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(1072182)
출원번호 10-2022-0142833 (접수번호 1-1-2022-1153573-69)
(DAS접근코드EBEC)
출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명 특허법인이클리온(9-2016-100061-5)
발명자성명 최인수 김동휘 김다운 김재형 이중복 박승용 송창선 이상원
발명의명칭 Heme oxygenase-1 유도에 의한 Hemin의 COVID-19의 치료 효능 평가

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

Article

First Detection and Genetic Characterization of New Equine Parvovirus Species Circulating among Horses in Korea

Jungho Yoon ^{1,2}, Taemook Park ¹, Ahram Kim ¹, Heeun Song ¹, Byung-Joo Park ², Hee-Seop Ahn ², Hyeon-Jeong Go ², Dong-Hwi Kim ², Joong-Bok Lee ², Seung-Yong Park ², Chang-Seon Song ², Sang-Won Lee ² and In-Soo Choi ^{2,*}

¹ Equine Clinic, Jeju Stud Farm, Korea Racing Authority, Jeju 63346, Korea; j.yoon@gmail.com (J.Y.); taemook7@gmail.com (T.P.); ahkim@naver.com (A.K.); heeun123@gmail.com (H.S.)
² Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea; rjshsd@naver.com (B.-J.P.); hys2@naver.com (H.-S.A.); hseop@naver.com (H.-J.G.); dhwkim@naver.com (D.-H.K.); jbl@konkuk.ac.kr (J.-B.L.); syop@konkuk.ac.kr (S.-Y.P.); cswon@konkuk.ac.kr (C.-S.S.); ischoi@konkuk.ac.kr (I.-S.C.)
* Correspondence: ischoi@konkuk.ac.kr; Tel: +82



Citation: Yoon, J.; Park, T.; Kim, A.; Song, H.; Park, B.-J.; Ahn, H.-S.; Go, H.-J.; Kim, D.-H.; Lee, J.-B.; Park, S.-Y.; et al. First Detection and Genetic Characterization of New Equine Parvovirus Species Circulating among Horses in Korea. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 268. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110268>

Academic Editor: Katrin Strutzelberg-Minder

Received: 8 October 2021
Accepted: 5 November 2021
Published: 7 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Equine parvovirus-cerebrospinal fluid (EqPV-CSF) and eqcopivirus (EqCoPV) are new parvovirus species (EqPVs) identified from various tissues (CSF, blood, and respiratory swabs) in horses with neurologic and respiratory diseases. In this study, we described the prevalence rate of EqPV-CSF and EqCoPV in 133 and 77 serum and fecal samples, respectively, using polymerase chain reaction. Further, we analyzed the potential risk factors for infection. We calculated the nucleotide and amino acid similarity and constructed phylogenetic trees. There was a moderate-to-high prevalence rate (EqPV-CSF: 3.8%; EqCoPV 9.8%) of each virus in serum; moreover, age, country of foaling, and clinical colic signs were significantly associated with the EqPVs infection. The newly identified EqPV-CSF/EqCoPV genomes had high nucleotide and amino acid identities with previously isolated strains in the USA. In phylogenetic analysis, they clustered and formed a new subgroup in the genus *Copiparvovirus*. To our knowledge, this is the first field epidemiologic study on EqPV-CSF and EqCoPV using both serum and fecal samples. Our findings demonstrate the risk factors for infection and could facilitate the development of disease prevention strategies.

Keywords: equine parvovirus; equine parvovirus-CSF; eqcopivirus; horses; prevalence; risk factor

1. Introduction

Since the first isolation of the equine parvovirus in 1985, three equine parvovirus species (EqPVs), which belong to the genus *Copiparvovirus* and family *Parvoviridae*, were identified; namely, equine parvovirus-cerebrospinal fluid (EqPV-CSF, 2015), equine parvovirus-hepatitis (EqPV-H, 2018), and Eqcopivirus (EqCoPV, 2019) [1–4]. Except for EqPV-H, which is an etiologic agent for equine serum hepatitis [4–15], the other two species have not been well investigated.

EqPV-CSF was first isolated in 2015 from cerebrospinal fluid (CSF) in a horse with neurological signs and lymphocytic pleocytosis in the USA [2]. Subsequently, a Chinese study reported a high prevalence of EqPV-CSF nucleotide (25.3%, 39/152) in sera obtained from imported horses in Western Europe but not local horse breeds [16]. In 2019, EqCoPV, which is another novel equine parvovirus, was isolated in the USA from horse plasma, CSF, and respiratory swabs from 14 horses [1]. However, the relationship between EqPV-CSF/EqCoPV and clinical disease in horses remains unclear given the limited sample sizes and missing evidence [1,16].

This is the first study to report the prevalence and genetic history of EqPV-CSF and EqCoPV among horses in Korea using serum and fecal samples. Studies have demonstrated that EqPV-CSF circulates in imported horses or offspring of imported dams. Unlike

scientific reports



OPEN Hemin as a novel candidate for treating COVID-19 via heme oxygenase-1 induction

Dong-Hwi Kim¹, Hee-Seop Ahn¹, Hyeon-Jeong Go¹, Da-Yoon Kim¹, Jae-Hyeong Kim¹, Joong-Bok Lee¹, Seung-Yong Park¹, Chang-Seon Song¹, Sang-Won Lee², Sang-Do Ha³, Changsun Choi³ & In-Soo Choi^{1,2,3}

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the causative agent of the coronavirus disease-19 (COVID-19). More than 143 million cases of COVID-19 have been reported to date, with the global death rate at 2.13%. Currently, there are no licensed therapeutics for controlling SARS-CoV-2 infection. The antiviral effects of heme oxygenase-1 (HO-1), a cytoprotective enzyme that inhibits the inflammatory response and reduces oxidative stress, have been investigated in several viral infections. To confirm whether HO-1 suppresses SARS-CoV-2 infection, we assessed the antiviral activity of hemin, an effective and safe HO-1 inducer, in SARS-CoV-2 infection. We found that treatment with hemin efficiently suppressed SARS-CoV-2 replication (selectivity index: 249.7012). Besides, the transient expression of HO-1 using an expression vector also suppressed the growth of the virus in cells. Free iron and biliverdin, which are metabolic byproducts of heme catalysis by HO-1, also suppressed the viral infection. Additionally, hemin indirectly increased the expression of interferon-stimulated proteins known to restrict SARS-CoV-2 replication. Overall, the findings suggested that HO-1, induced by hemin, effectively suppressed SARS-CoV-2 in vitro. Therefore, HO-1 could be potential therapeutic candidate for COVID-19.

Since the coronavirus disease-19 (COVID-19) outbreak was first reported in Wuhan, China, more than 143 million cases have been reported, and currently, the global death rate is 2.13%. COVID-19 is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), and the major symptoms of COVID-19 include fever, dry cough, chest pain, and fatigue, whereas headaches, dizziness, abdominal pain, and diarrhea are also observed in rare cases¹. To date, antiviral drugs effective against human immunodeficiency virus (HIV), influenza virus, Ebola virus, hepatitis virus, cytomegalovirus (CMV), and herpes simplex virus have been used in attempts to treat COVID-19; however, no specific drug has been approved for the treatment of COVID-19 due to the variable treatment effects on the virus². Therefore, owing to the rapid spread of COVID-19 worldwide, it is necessary to not only develop new vaccines but also to consider whether previously known antiviral agents can suppress SARS-CoV-2 replication³.

Heme oxygenase-1 (HO-1), encoded by *Hmox1*, is a cytoprotective enzyme that inhibits the inflammatory response and reduces oxidative stress⁴. HO-1 expression can be induced by hemin, CoPP-9, and andrographolide⁵⁻⁷. HO-1 catalyzes heme into carbon monoxide, biliverdin, and iron, which are also known to inhibit the proliferation of various viruses⁸. HO-1 was also shown to interact with interferon (IFN) regulatory factor 3, independent of its enzyme activity, which activated the type I IFN response to inhibit infection by influenza A virus⁹. Hemin, which is the representative HO-1 inducer, has antiviral effects against several viruses including hepatitis A virus¹⁰⁻¹². Induction of HO-1 with other chemicals demonstrates the antiviral activity against hepatitis B and C viruses, Ebola virus, HIV, dengue virus, Zika virus, and human respiratory syncytial virus^{13,14}. The suitability of HO-1 as an antiviral candidate for SARS-CoV-2 has been discussed in recent studies^{15,16}.

In this study, we primarily used hemin to induce HO-1 expression, which led to a reduction in SARS-CoV-2 replication in vitro. We also attempted to identify the basic mechanisms underlying the antiviral effects of HO-1, with respect to its enzymatic as well as non-enzymatic functions.

¹Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Republic of Korea. ²Advanced Food Safety Research Group, BrainKorea21 Plus, Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi 17546, Republic of Korea. ³Department of Food and Nutrition, School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi 17546, Republic of Korea. [✉]email:

Molecular surveillance of equine parvovirus-hepatitis from oral, nasal, vaginal, and semen specimens collected from horses living in Korea

Jungho Yoon^{1,2} | Taemook Park¹  | Ahram Kim¹ | Jongyoung Park¹ |
Byung-Joo Park² | Hee-Seop Ahn² | Hyeon-Jeong Go² | Dong-Hwi Kim² |
Joong-Bok Lee² | Seung-Yong Park² | Chang-Seon Song²  | Sang-Won Lee²  |
In-Soo Choi^{2,3} 

¹Equine Clinic, Jeju Stud Farm, Korea Racing Authority, Jeju-si, Korea

²Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

³XU Center for Animal Blood Medical Science, Konkuk University, Seoul, Korea

Correspondence

In-Soo Choi, Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea.
Email: chois@konkuk.ac.kr

Funding Information

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Grant/Award Number: 220005-04-3-SB0a0

Abstract

Equine parvovirus-hepatitis (EqPV-H) is one of the etiological agents of Theiler's disease, causing fulminant hepatitis; however, its transmission route and pathogenesis remain unclear. In the present study, we aimed to determine EqPV-H shedding in oral/nasal/vaginal swabs or semen samples from horses living in Korea using nested polymerase chain reaction. We then used the data obtained to investigate various risk factors associated with EqPV-H including viral shedding, hepatopathological changes, and genetic diversity. Our data revealed occurrence of EqPV-H shedding in these animals (oral: 3/102 [2.9%]; nasal: 3/102 [2.9%]; semen: 1/9 [11.1%]) and identified that both age and country of foaling were significantly associated with EqPV-H shedding ($p < .05$). In addition, we noted that one of the newly isolated strains clustered separately from the other strains in the phylogenetic tree, revealing unique nucleotide and amino acid substitutions. This is a field surveillance study providing evidence of natural and venereal shedding of EqPV-H and describing its presence in both oral/nasal fluids and semen. This epidemiological and clinical analysis may help specify the clinicopathological features of EqPV-H and facilitate the development of novel disease prevention strategies.

KEYWORDS

equine parvovirus-hepatitis, hepatitis, prevalence, risk factor, Theiler's disease, virus shedding

1 | INTRODUCTION

Equine parvovirus-hepatitis (EqPV-H) is a potential etiologic agent of Theiler's disease (TD) and can induce both acute and fulminant hepatitis in horses (Theiler, 1919; Tomlinson, Van de Walle, & Divers, 2019). This virus was first identified in a deceased animal presenting with acute serum hepatitis following inoculation with tetanus antitoxin in 1918. Follow-up investigations revealed that TD transmission is associated with several equine biological products, including

plasma, antitoxin, antiserum, and allogeneic stem cells (de Moraes et al., 2022; Divers et al., 2018; Meister, Tegtmeyer, Postel, et al., 2019; Tomlinson et al., 2020; Tomlinson et al., 2019; Vengust et al., 2020).

EqPV-H is distributed worldwide and its DNA prevalence ranges from 7.1% to 17%, while its seroprevalence ranges from 15% to 34.7% in the United States, China, Germany, Austria, Brazil, and Korea (Altan et al., 2019; Badenhorst et al., 2022; de Moraes et al., 2022; Divers et al., 2018; Lu et al., 2018; Lu, Wu, Ou, & Li, 2020; Meister, Tegtmeyer,



Short communication

Surveillance of hepatitis E virus in the horse population of Korea: A serological and molecular approach

Jungho Yoon^{a,b}, Taemook Park^a, Yongwoo Sohn^a, Sang-kyu Lee^a, Byung-Joo Park^b, Hee-Seop Ahn^b, Hyeon-Jeong Go^b, Dong-Hwi Kim^b, Joong-Bok Lee^b, Seung-Yong Park^b, Chang-Seon Song^b, Sang-Won Lee^b, In-Soo Choi^{b,c,*}

^a Equine Clinic, Jeju Stud Farm, Korea Racing Authority, Jeju-si, Jeju 63346, Republic of Korea

^b Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Republic of Korea

^c KU Center for Animal Blood Medical Science, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

Hepatitis E virus
Horses
Prevalence
Risk factor
Zoonosis

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an emerging zoonotic pathogen causing hepatitis worldwide. Despite the prevalent evidence of interspecies HEV infection in various animal species, the role of horses in HEV epidemiology remains unclear. In this study, we investigated the prevalence of HEV infection in 283 blood and 114 fecal samples from 397 horses using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Among the 283 serum samples, 35 were positive for anti-HEV antibodies (12.4%; 95% confidence interval: 8.8–16.8), and four of the five sampling regions (80%) had these seropositive individuals. Analyses of the potential risk factors for HEV infection revealed that racing horses had a significantly higher risk of infection ($P = 0.01$). However, HEV RNA was not detected in any of the tested serum and fecal samples. To the best of our knowledge, this is the first epidemiological HEV study on horses in Republic of Korea, thereby providing evidence of HEV exposure in the horse population in Korea and specifying the risk factors for HEV infection.

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV), a member of the family *Hepadnaviridae* and genus *Orthohepevirus*, is a major zoonotic pathogen causing viral hepatitis worldwide (Nan et al., 2017; Hien et al., 2012). The clinical spectrum of HEV infection includes subclinical infection, self-limiting acute hepatitis, fulminant hepatic failure, and chronic hepatitis in immunocompromised persons (Doceul et al., 2016; Kamar et al., 2008; Seifler et al., 2011). The mortality rate of HEV infection is usually low (<1%); however, it is high in pregnant women (>20%) and is associated with preterm delivery (>65%) in developing countries (Kumar et al., 2004; Kamar et al., 2013).

The genus *Orthohepevirus* includes four species: *Orthohepevirus A*, *B*, *C*, and *D* (Doceul et al., 2016). Among them, *Orthohepevirus A* is a major public health concern because of its wide host range, including humans, pigs, rabbits, wild boars, deer, and camels (Aspinall et al., 2017; Doceul et al., 2016). Other *Orthohepevirus* species traditionally believed to have minimal zoonotic risks because of their narrow host range due to the

lack of evidence on transmissibility to other species as well as wide phylogenetic divergence from *Orthohepevirus A* (Doceul et al., 2016; Purcell et al., 2011; Smith et al., 2014). However, in the last few years, the circulation of *Orthohepevirus C* is reported in humans and antibodies against *Orthohepevirus C* genotype 1 (rat HEV) have been confirmed in stray cats and dogs in Europe (Andonov et al., 2019; Caballero-Gómez et al., 2021; Sridhar et al., 2018; Sridhar et al., 2021). In addition, RNA of rodent-borne strain was detected in a Syrian brown bear in zoo of Germany and experimental cross-species transmission of rat HEV to non-human primate was demonstrated (Spahr et al., 2017; Yang et al., 2022).

HEV infection in humans is no longer limited to certain developing countries; HEV has spread to various high-income countries, including Korea, where it most commonly causes acute viral hepatitis (Dalton et al., 2018; Jeong, 2011). In Korea, the meta-analyzed seroprevalence of anti-HEV IgG was 9.3% (Li et al., 2020), and the proportion of acute hepatitis cases caused by HEV is sharply increasing (Jeong, 2011). Although zoonotic HEV infection is common, the role of horses as reservoirs remains unclear (García-Bucanegra et al., 2019; Nan et al.,

* Corresponding author at: Department of Infectious Diseases, Konkuk University College of Veterinary Medicine, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Republic of Korea. E-mail address: ischoi@konkuk.ac.kr (I.-S. Choi).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105317>

Received 27 March 2022; Received in revised form 8 June 2022; Accepted 13 June 2022

Available online 20 June 2022

1567-1348/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

***Corresponding author:**

In-Soo Choi

Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea
Tel: +82-2-
E-mail:
<https://orcid.org/0000-0001-7266-6571>

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Received: May 10, 2023

Revised: Jun 5, 2023

Accepted: Jun 7, 2023



© 2023 The Korean Society of Veterinary Science.
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.kjvr.org

Experimental infection of a porcine kidney cell line with hepatitis A virus

Dong-Hwi Kim¹, Da-Yoon Kim¹, Jae-Hyeong Kim¹, Kyu-Beom Lim¹, Joong-Bok Lee^{1,2}, Seung-Yong Park^{1,2}, Chang-Seon Song^{1,2}, Sang-Won Lee^{1,2}, In-Soo Choi^{1,2,3,*}

¹Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

²Konkuk University Zoonotic Diseases Research Center, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

³KU Center for Animal Blood Medical Science, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

Abstract

The hepatitis A virus (HAV) induces severe acute liver injury and is adapted to human and monkey cell lines but not other cells. In this study, the HAV was inoculated into porcine kidney (PK-15) cells to determine its infectivity in porcine cells. The growth pattern of the HAV in PK-15 cells was compared with its growth pattern in fetal rhesus kidney (FRhK-4) cells. The growth of HAV was less efficient in PK-15 cells. In conclusion, HAV replication was verified in PK-15 cells for the first time. Further investigations will be needed to identify the HAV-restrictive mechanisms in PK-15 cells.

Keywords: hepatitis A virus; humans; swine; cells; replication

Hepatitis A is a disease caused by an infection with the hepatitis A virus (HAV). The HAV, a positive-sense single-stranded RNA virus with a 7.5 kb genome, belongs to the genus, *Hepatovirus*, family, *Picornaviridae* [1]. The HAV was initially classified as a non-enveloped virus, but a recent study reported that this virus could exist in an enveloped form by hijacking the cellular membranes [2]. The HAV is hepatotropic and produces viremia by replicating in liver tissue. After replication, the virus is released into bile, where the detergent action of bile salts removes the envelope, resulting in its eventual excretion in feces [3]. The virus can cause mild to severe symptoms, including jaundice, fatigue, and abdominal pain, affecting an estimated 1.4 million people yearly. In addition, approximately 113 million people become infected with the HAV but do not develop symptoms [4]. Although the disease is rarely fatal, it can cause debilitating symptoms. In rare cases, however, it can lead to deadly acute liver failure (fulminant hepatitis). Hepatitis A occurs sporadically and in epidemics worldwide and tends to recur cyclically. The HAV is typically transmitted through direct contact with infected individuals or by ingesting contaminated food or water, making it one of the most common causes of foodborne infections. The virus spreads through the fecal-oral route, meaning that it is present in the feces of infected individuals and can be transmitted when contaminated fecal matter enters the mouth [5-7]. Despite the availability of effective vaccines, HAV infections remain a serious public health concern worldwide.

The Human HAV has been propagated successfully in a monkey kidney cell line [8]. Previous studies reported that the HAV only infects humans and non-human

[인프라 성과]
[그 밖의 성과]

○ 2-1세부

1) MOU 체결 성과

- 가. 중국 산둥성농업과학원 가금연구소(22.02.15.) : 국제공동연구, 연구원교류 등
- 나. 일본 국립미야자키대학 산업동물방역연구센터(22.07.12) : 국제공동연구, 연구원교류 등



[ARC-SAAS MOU 체결]



[ARC-CADIC MOU 체결]



2) 비교과과정 운영

- 가. 수의학과 및 관련 학과 학부생 대상 동·하계 현장실습과 아카데미 교육 실시



2) 목표 달성 수준

○ 1-1세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 돼지 세균성 소화기계 감염병 원인체 특성조사 및 분리주 유전자원 확보	○ 국내 양돈 약 500농가 대상 대장균, 살모넬라 등 약 760여 균주의 미생물학적 특성 조사 및 주요 병원성 원인체의 항생제 감수성 및 내성인자 특성조사를 완료하고, 분리주에 대한 유전자원 확보를 완료하였음.	○ 100%
○ 주요 병원성 원인체의 항원 및 병원성 유전자 검색을 통한 분자생물학적 특성 조사	○ 국내 양돈농가 유래 병원성 대장균의 부착인자, 독소산생 유전자 분석 및 유전학적 상동성 비교분석을 통하여 국내 우세 병원성 균주는 높은 유전학적 근연관계를 보이는 분자생물학적 특성을 확인함.	○ 100%
○ 분자생물학적 기법을 이용한 소화기계 감염병 원인균 신속진단 검출기법 개발	○ 세균성 돼지 소화기계 감염병 진단을 위한 특이적 primer를 제작하여, Multiplex PCR법을 이용한 신속진단검출기법을 개발하였으며, 국내 분리주를 이용한 교차반응 검사를 통하여 유용성을 확인함.	○ 100%
○ 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발	○ 신속진단 기법 개발 및 이를 활용한 돼지 소화기계 감염병 5종 원인체 (pathogenic <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> 및 <i>Lawsonia intracellularis</i>)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하였으며, 현장진단 적용시험을 통해, 신속진단 키트가 현장에서 즉시 적용이 가능함을 확인하였음.	○ 100%

○ 1-2세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 동물질병 역학조사 및 예찰정보 생산 및 활용기반 기능 개발	○ ICT 돈사 관리 시스템을 이용하여 예찰정보 및 개체정보 등을 아우르는 전체적인 사양관리 기능 개발 완료	○100
○ 동물전염병의 확산경로 등 지리정보 생산 및 활용기반 기능 개발	○ ICT 돈사 관리 시스템의 위치정보를 이용하여 돈사의 위치를 데이터화하여 동물전염병 확산 경로를 예측할 수 있는 데이터를 활용(방역, 접촉여부 등)이 가능하도록 기능 개발 완료	○100
○ IoT 센서 데이터 수집 및 활용기반 기능 개발	○ ICT 돈사 관리 시스템의 CCTV 데이터를 통하여 데이터를 수집할 수 있으며, 해당 IoT 센서와 결합하여 행동분석 패턴을 구분할 수 있는 기능 개발 완료	○100
○ 데이터 수집 및 활용 채널 다변화를 위한 모바일 앱 설계	○ ICT 돈사 관리 시스템의 구성은 반응형 웹/앱 시스템으로 구성하여, 모바일 어플리케이션으로 개발 가능하도록 설계 진행 완료	○100
○ 룰 기반 동물전염병 발병 가능성분석 및 확산 예측 모델 구축	○ ICT 돈사 관리 시스템의 위치정보 데이터, 센서 데이터 등을 통하여 전염병 위치 및 환경 상태를 통하여 전염병 발병 가능성을 분석할 수 있으며, 정형화된 데이터를 통하여 예측 모델을 구축하는 기능을 구성	○100
○ 돼지 번식계통 감염병 관리를 위한 병원체 핵산추출 프로토콜 확립	○ 동물병원으로부터 샘플링한 병원체 양성 컨트롤을 활용해 체계적인 병원체 핵산 추출기법 정착	○100
○ 모바일 어플리케이션 개발로 인한 사용성 및 안전성 증대	○ 동물전염병 발병 가능성 분석 및 확산 데이터 구축을 위하여 가축의 이동 경로를 GPS로 파악 할 수 있는 모바일 어플리케이션을 개발하여 발병을 예측하고 파악할 수 있는 안전성 및 사용성을 증대	○100
○ 모바일 어플리케이션 관련 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화 방안	○ 온/습도 및 암모니아 센서 등 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 확산 예측모델 고도화를 방안하고 구역마다 설치된 IoT 장비를 통하여 발병 분석 및 가축 생활 환경에 대한 정보를 확인할 수 있는 데이터 구축	○100

○ 1-1협동

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 최근 국내 발생 현황 조사 및 시험백신의 생산	○ 2013년 ~ 2019년 국내 가금아데노바이러스 발생현황을 조사하여 논문화 완료, 4형/8b형/11형 3가 백신의 필요성에 대한 근거 확보, 시험백신 생산	○ 100
○ 시험백신의 실험실 내 평가 및 임상시험 승인	○ 시험백신의 전임상 시험 완료, 농림축산검역본부 임상시험 승인[2021년 8월]	○ 100
○ 아데노 다가백신의 야외임상 시험 진행	○ 국내 3개 육용종계 농장을 대상으로 야외임상 시험 진행. 안전시험(접종부작용, 폐사율, 산란율 및 부화율), 종계군 면역지속능, 후대병아리 모체이행항체 및 공격접종 방어능 평가	○ 100
○ 아데노 다가백신의 품목허가 및 백신 프로그램의 개발	○ 농림축산검역본부로부터 동물용의약품 제조품목허가 승인 완료[2023년 3월], 종계군에 14-15주령 “포울샷® 아데노 3가” 1회 접종으로 백신 프로그램 개발	○ 100
○ 특허출원	○ 목표 2건, 달성 2건	○ 100
○ 특허등록	○ 목표 1건, 달성 1건	○ 100
○ 제품화	○ 목표 1건, 달성 3건	○ 100
○ 매출액	○ 목표 400백만원, 달성 161.98백만원	○ 300
○ 고용창출	○ 목표 1건 달성	○ 40.5
○ 논문(SCI)	○ 목표 2건, 달성 1건	○ 100
○ 논문(비SCI)	○ 목표 2건, 달성 0건	○ 50
○ 홍보전시	○ 목표 3건, 달성 3건	○ 0
		○ 100

○ 1-2협동

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 국내 요네병 감염 실태 조사 및 진단법 개발	○ 국내 농가의 요네병 감염실태 확인 및 각 지역에 따른 역학조사 수행. mRNA를 이용한 진단방법 개발	○100%
○ 류코시스 감염 실태 조사 및 진단법 도입 및 적용	○ 생산성 저하 농가에서의 류코시스 감염을 조사 및 LSIT 등 신기술을 이용한 류코시스 진단방법 적용	○100%

○ 2-1세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○가금농장 및 야생조류 유래 전염성질병 실태조사 및 특성연구	○닭, 오리농장 유래 주요 전염성 질병 실태조사 ○야생조류 유래 주요 전염성 질병 실태조사 ○주요 병원체 분리동정 ○바이러스 분리주 유전체 정보 분석 ○세균 분리주 항생제 내성 특성연구	○ 100%
○가금농장 및 야생조류 유래 병원체의 상호연관성 규명	○바이러스 분리주 phylogenetic tree 분석을 통한 연관성분석 ○세균 분리주 PFGE 분석을 통한 연관성 분석	○ 100%
○닭 호흡기성 질병 동시진단법 개발 및 실증	○닭 전염성기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 개발 ○닭 전염성기관지염, 조류인플루엔자, 뉴캐슬병 동시진단법 실증	○ 100%
○오리 소화기성 질병 동시진단법 개발 및 실증	○오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 개발 ○오리장염, 리메렐라, 살모넬라 감염증 동시진단법 실증	○ 100%

○ 2-3세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ H. longicornis의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색	○ H. longicornis의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 3건의 유용 유전자의 탐색	○ 100
○ 각 단계별 진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 탐색	○ 진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 각 단계별 탐색	○ 100
○ 재조합 유전자의 전염병에 대한 면역 정상검사	○ 재조합 유전자를 활용한 진드기 매개 질병에 대한 효능 검증을 수행함	○ 100
○ 생리활성단백질의 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증	○ 선발된 생리활성단백질인 에놀라제를 활용한 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증	○ 100

○ 3-1세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ PRRSV 감염성 클론에 돼지 IL-2 유전자를 클로닝 기법으로 삽입	○ 클로닝 기법을 이용하여 ORF1b와 ORF2 유전자 사이 공백에 돼지 IL-2 유전자 삽입 완료	○ 100
○ 재조합바이러스, 대식세포와 수지상세포를 이용한 폐 병변 재현	○ TGB, INF 등 사이토카인 분석을 통한 병변 발현 인자 확인	○ 100
○ 돼지접종실험을 통한 폐 병변 발생 원리 증명	○ 4주령 돼지에서 추출한 말초 혈액 단핵세포 군에 돼지 인터류킨2 발현 물질을 첨가한 후 변화를 관찰하였으며, 그 결과 T 세포와 B 세포 군집의 증가 확인	○ 100
○ PRRSV 미끼항원결정부에 따른 항체 분광형 확인	1. PRRSV 중 K148과 K418DM 접종을 통해 얻어낸 hybridoma에서 항체 라이브러리 확보 완료.	○ 100
1. PRRSV 동물 접종을 통해 미끼항원결정부에 대한 항체 라이브러리 확보	2. NGS 항체 라이브러리 분석	○ 90
2. NGS 기법을 이용한 항체 라이브러리 분석	3. 항체 분광형 분석을 통한 미끼항체 서열 확인	○ 90
3. 항체 분광형 분석을 통한 미끼항체 서열 확인		○ 100
○ 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 확인	○ 돼지를 이용한 in vivo 실험 결과 peptide ELISA를 통한 항체 형성에 대한 평가는 O1m15 peptide antigen을 사용한 peptide ELISA 실험결과로 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 확인할 수 있음.	○ 100
○ 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 미끼 항체 및 중화항체 합성	○ 돼지를 이용한 in vivo 실험 결과, hypo-glycosylated chimeric diva virus가 임상 증상, 체온, ADWG, viremia level 상에서 병원성이 없고 안전함을 확인함. Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus 접종군은 1:8 이상의 높은 중화항체를 나타내어 미끼 항체 및 중화항체를 확보.	○ 100
○ 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 ORF7 항원 결정부 확인	○ Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus는 DIVA를 형성하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 ORF7의 항원 결정부를 확인할 수 있음.	

○ 3-2세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 가금티푸스 의심 검체에서 <i>Salmonella Gallinarum</i> 균주 순수 분리	○ 가금티푸스 의심 검체에서 <i>Salmonella Gallinarum</i> 순수 야외분리주 7종 및 백신주 1종 균주 자원을 확보함	○ 100 ○ 100 ○ 100
○ <i>Salmonella Gallinarum</i> 의 전장 유전체 확보	○ 확보한 <i>Salmonella Gallinarum</i> 순수 야외분리주 7종 및 백신주 1종에 대한 전장유전체를 확보함	○ 75 ○ 100
○ <i>Salmonella Gallinarum</i> 백신주와 야외주 감별진단 PCR primer 개발	○ <i>Salmonella Gallinarum</i> 9R 백신주에 대한 감별진단 primer를 제작함.	○ 100 ○ 50
○ 가금 세균성 호흡기계 감염병 의심 검체 유래 <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS)/ <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG) 순수분리	○ MS 순수 야외분리주 4종 및 백신주 2종 균주 자원을 확보함	○ 100 ○ 100
○ MS/MG 균주 항생제 내성 프로파일 확보	○ 국내 야외 MS 분리주의 MIC를 포함한 항생제 감수성 데이터 확보함	○ 100 ○ 100
○ MS의 항생제 내성 유전자 진단 후보군 확보	○ 전장유전체 비교 분석을 통해 MS의 항생제 내성 유전자 진단 후보군을 확보함	
○ Oxytetracycline과 Tiamulin에 내성을 갖는 MS 제작	○ 계대배양을 통해 Oxytetracycline에 내성을 갖는 MS를 제작함.	
○ Oxytetracycline과 Tiamulin 항생제 내성 진단용 PCR primer 개발	○ Oxytetracycline 내성 MS에 대한 전장유전체를 확보한 후 비교 분석을 통해 Oxytetracycline 내성 유전자 진단용 PCR primer를 제작함.	
○ 닭 도체 검체에서 살모넬라 균주 순수 분리	○ 닭 도체 유래 살모넬라 38종을 확보함	
○ 닭 도체 유래 살모넬라의 항생제 내성 프로파일 확보	○ 확보한 닭 도체 유래 살모넬라 38종의 MIC를 포함한 항생제 내성 데이터를 확보함	
○ 닭 도체 유래 살모넬라의 항생제 내성 유전자 데이터 확보	○ 항생제 다제내성 살모넬라 33종에 대해서 유전형 데이터 확보함.	

○ 3-3세부

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 돼지 분변으로부터 바이러스 유전체 추출 및 확보	○ 양돈 농장에서 사육단계별 (포유, 이유, 육성, 비육) 분변 시료 채취	○ 100
○ 종합효소 연쇄반응을 통해 유전체 검출 비율 확인	○ 분변 유제 및 분변 샘플 확보 후 column pathogen extraction 기법을 이용하여 RNA 추출 ○ 종합효소 연쇄반응을 진행하기 위해 노로바이러스 및 E형 간염바이러스 검출 프라이머 제작	○ 100
○ 확보된 유전체의 유전자 염기서열 분석	○ Tm (Melting temperature) 설정 등의 종합효소 연쇄반응 진행 조건 최적화 과정 ○ Sanger-sequencing 기법을 이용하여 확보된 유전자의 염기서열 확인	
	○ Sequencing primer를 제작하여 부분 및 전장 유전자 확보	○ 100

○ 각 Open Reading Frame 별 유전자 염기 서열 분석하여 발현될 단백질의 특성 파악	○ Open Reading Frame 별 유전자 염기 서열을 cloning하여 발현벡터에 삽입하여 발현되는 단백질 확인	○100
○ 유전체의 염기서열 분석 결과와 국내외 검출된 유전체의 염기서열과 비교 분석	○ 국내외에서 검출된 바이러스 유전체의 염기서열과 비교하여 nucleotide 유사도 확인	○100
○ 계통분석을 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인	○ 국내외에서 검출된 바이러스 유전체 염기서열을 이용하여 phylogenetic analysis를 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인	○100
○ 확보된 유전자를 클로닝을 통해 항원 생산	○ Capsid gene을 cloning 후 발현벡터에 삽입하여 capsid protein을 발현시켜 항원 생산	○100
○ 생산된 항원으로 단일클론항체 생산	○ 생산된 항원을 마우스에게 주입하여 단일클론항체 생산 후 키트 개발	○60

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 1-1세부

목표 미달인 특허출원 1건의 경우, 4차년도 연구내용을 정리하여 특허출원 준비중에 있어, 24년도에 특허출원이 문제없이 가능할 것으로 판단됨. 또한 목표미달인 특허등록 2건의 경우 현재 출원 중인 특허 1건과 특허출원 준비 중인 1건에 대해서는 특허청의 심사 진행에 따라 앞으로 1-2년 내에 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

○ 1-1협동

● 매출액 목표 400백만원에서 약 162백만원(40.5%)의 매출을 달성

- 제조품목 허가 후 1년간의 매출을 가정하고 400백만원 목표를 설정하였으나 제조품목허가가 예상보다 늦어지면서 실제적인 판매 기간이 약 4개월(2023년 9월 이후) 정도가 되면서 목표 대비 부족한 매출 달성

- 현재도 특별한 이슈 없이 꾸준한 매출이 발생하고 있어, 백신의 안전과 효능에 있어서는 시장에서 인정을 받고 있음

● 논문(SCI 및 비SCI)

- 현재 2건의 논문에 대한 투고 및 review가 진행되고 있는 상황으로 제품화 및 매출발생 목표에 집중하면서 논문 투고가 늦어졌고, review 기간도 예상보다 길어지면서 목표에 미달한 것으로 판단

○ 2-3세부

특허 관련 출원에 따른 등록까지 시간이 많이 걸려서 특허 출원은 하였으나 등록까지 목표로 한 것은 시간이 지나면 해결될 것으로 판단됨

○ 3-2세부

2차년도 목표 미달

Trachea와 Cleft palate swab 샘플에서 MS/MG를 검출 및 분리배양을 시도했으나 MG는 검출되지 않음. 본 연구팀은 샘플의 개수가 충분하지 않으며 한국에서 MG 양성률이 낮기에 MG가 검출되지 않은 것으로 판단함.

3차년도 목표 미달

Tiamulin이 들어간 배지에서 MS를 계대배양하여 Tiamulin에 내성을 갖는 MS의 제작을 시도하였으나 MIC breakpoint를 넘는 MS를 제작하지 못함.

2) 자체 보안활동

- 특허 출원 후 특허 등록까지 보통 2~3년의 시간이 필요하며, 현재 출원 된 특허의 등록이 모두 잘 마무리 되도록 과제 종료 후에도 노력 할 예정임
- 2025년까지 특허등록 계획 15건이 모두 연구성과로 등록될 수 있도록 노력할 예정임.
- 1-1세부
돼지 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발의 내용으로 과제 종료 후 1년 내에 특허 출원 준비 중에 있음.
- 1-1협동
 - 매출액 : 현재도 꾸준한 매출이 발생하고 있으며 경쟁사의 경쟁제품들 대비 우위를 유지하기 위해 혈청검사 서비스 등 다양한 마케팅 활동도 더불어 진행 중
 - 논문 : 투고 진행 중인 2건에 대한 대응에 집중, 최종 저널 게재를 위해 노력 중
- 2-3세부
추가적인 보완사항은 특허가 등록되기 까지 자료의 정리와 등록에 대한 것을 준비할 것임

3) 연구개발 과정의 성실성

- 1-1세부
돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발의 연구개발 과정을 통하여 달성 목표 중 SCIE 논문 7건 대비 28건, 기술실시 2건 대비 4건, 고용창출 4건 대비 13건, 홍보전시 7건 대비 13건, 인력양성(일반) 2건 대비 5건 및 인력양성(특수) 3건 대비 4건으로, 대부분의 달성 목표를 초과달성하는 연구 성과를 얻었음. 따라서 연구과제 성과 달성을 위하여 성실하게 연구개발 과정을 진행하였다고 판단됨.
- 1-2세부
ICT 기반 돈사 관리 시스템의 개발과 돼지 번식의 과학적인 연구 과정을 목표로, 지속적인 데이터 수집과 분석, 그리고 새로운 기술과 지식의 활용에 성실히 임하였다. 이 성과들은 발전된 효율적인 돈사 관리를 통한 축산업 발전에 기여할 것이라 기대한다.
- 1-1협동
 - 동물용의약품 중 생물학적제제인 백신의 경우 일반적으로 제품 개발 및 허가에 걸리는 기간이 길지만, 4년의 연구개발 기간내에 제품 허가는 물론, 매출까지 발생하는 성과를 달성
 - 품목허가에만 그치지 않고 본 백신의 필요성을 뒷받침하는 연구논문, 런칭세미나 및 각 지역 대리점 세미나 등을 통해 향후 지속적인 매출발생을 위해 노력 중
- 2-3세부
본 연구의 과정은 진드기의 사육부터 시작하여 진드기의 주요활성 유전자의 탐색과 함께 미래의 진드기 백신의 초석이 될 수 있는 항원을 특정 하는 연구까지 진행되어 해당 항원의 특허 출원까지 성공하였으므로 성실히 연구가 수행되었다고 판단됨.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 1-1세부

● 돼지 소화기계 감염병 대책전략 수립을 위한 기초자료 확보

- 국내 현실에 맞는 백신 개발을 위해서는 양돈 농가 우세 병원성 유전자 조사가 필수적임
- 병원성 인자는 지역, 시기, 숙주에 따라 발생빈도 및 우점 패턴이 지속적으로 다르게 나타남
- 돼지 소화기계 감염병 양돈농가 우세 병원성 원인체의 병원성 특정 조사를 수행하여 백신

개발

등 감염병 관리 대책전략 수립에 필수적인 기초자료를 확보함

● 유전학적 분석을 통한 병원성 분석 및 병원성과 항생제 내성에 대한 학술적 이해도 향상

- 세균성 소화기계 감염병의 치료는 항생제 처방이 현실적인 대안이나, 항생제 내성균의 출현 및 내성률의 증가로 인하여 치료전략 수립에 난항을 겪고 있음
- 지표세균에 비하여 병원성 세균은 항생제 내성률이 높게 나타나는 것으로 알려져 있으나, 이에 대한 체계적인 연구 및 근거자료는 미흡한 실정임
- 유전학적 분석을 통하여 병원성 유전자와 항생제 내성간 상관성을 분석하였으며, 유전학적 패턴에 따라 특정 항생제 내성 패턴을 보유하고 있음을 확인함
- 결과적으로 병원성과 항생제 내성에 대한 이해도 향상과 향후 소화기계 감염병 치료 및 예방전략 수립을 위한 기초 연구 자료로 활용할 수 있음

● 현장 적용 가능한 돼지 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발

- 돼지 소화기계 감염병은 환돈의 폐사로 인한 직접적인 피해와 성장지연 등의 간접적인 피해로 양돈산업 생산성 저하의 주요 요인이며, 소화기계 감염병은 병원체, 숙주의 면역 및 사양관리간의 상호작용에 의한 발생으로 진단과 예방이 어려움
- 현재 국내에서는 병성감정기관으로 의뢰되는 가검물에 대한 진단을 통하여 전국의 질병상황을 파악하고 있으며, 농장 차원의 국내 발생 주요 소화기계 감염균에 대한 체계적인 조사 및 분리균에 대한 분자생물학적 특성에 대한 자료가 미흡한 실정임
- 본 연구를 통하여 국내 양돈장에서 중요한 세균성 소화기계 감염병 원인체의 특성조사 및 감염 실태를 조사하고, 분리균에 대한 병원성 인자 및 분자생물학적 특성조사 결과를 바탕으로 신속진단검출기법 개발을 하였으며, 최종적으로 현장에 적용할 수 있는 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트를 개발하였음
- 개발한 진단 기법의 활용으로 국내 양돈농가 소화기계 감염병의 신속진단이 가능하며, 이를 통하여 양돈 농가의 질병 피해를 감소시킬 수 있을 것으로 판단됨

○ 1-2세부

● 돼지 번식기계 관련 감염병 관리를 위한 실험관내 시스템 확보

- 농가에서 번식기계관련 감염병을 조기진단을 위한 샘플링 프로토콜 구축
- 돼지 번식기계 질환시 나타나는 사이토카인들이 난모세포의 성숙에 미치는 영향확인
- 병원체에 의한 태반감염을 시험관내에서 분석가능하도록 하는 영양막줄기세포 확립

● ICT 돈사 관리 시스템 사용으로 인한 농가의 데이터 수집 기여

- 농가에서 개체를 관리하기 용이하며, 원활한 데이터 수집 및 보관을 위한 돈사 관리 시스템 구축

● 통합 모니터링 시스템 구축

- 직접 돈사에 가서 확인하지 않아도 CCTV를 통하여 돈사의 전체적인 부분을 확인하고 개체의 움직임이나 특이상황에 대한 빠른 대처가 가능

● ICT 돈사 관리 시스템 웹/앱 어플리케이션 사용으로 인한 농가의 데이터 확인 및 수집 기여

- 웹/앱 어플리케이션으로 인하여 데이터 확인에 대한 사용성 증대 및 실시간 데이터 확인이 가능한 시스템 구축

● 수집된 데이터 구축을 통한 질병 발병 예측

- ICT 돈사관리 시스템에서 수집된 데이터를 통하여 질병의 발병을 예측하고, 질병의 발병을 예측하여 발병 확산 예측 모델 구축
- 구축된 예측 모델 및 수집된 데이터를 통하여 발병원인을 예측할 수 있으며, 발병 확산에 대한 예측 모델을 구축할 수 있음.

○ 1-1협동

● 국내 최초 가금 아데노바이러스 3가 백신 출시

- 경쟁사의 제품들은 단일 백신 또는 2가 백신
- 경쟁력 우위를 확보할 수 있는 과학적 근거자료(최신 가금 아데노바이러스 발생 현황 논문)

● 가금 아데노바이러스 방어에 있어 중화항체의 중요성 제시

- 지금까지 주로 ELISA 항체를 확인하는 경향에서 벗어나 각 혈청형 별 중화항체와 공격접종 방어능의 밀접한 상관관계 제시

● 해외시장 진출의 가능성 확보

- 국내 품목허가를 통한 성공적 제품 실증 사례 확보
- 전 세계적 주요 발생 혈청형이 4, 8b, 11형인 상황으로 해외시장 진출 가능성 높을 것으로 예상
- 실제 제품 품목허가 진행 중 다양한 해외 대리점 미팅 진행시 다양한 국가에서 관심을 표명하였고, 실제적인 논의 진행 중

○ 1-2협동

젖소에서 감염성 소모성 질병은 농가에 방역 대책 마련과 근절을 위한 체계 구축, 감염우 선별 등 큰 경제적 피해를 주고 있음. 그 중 요네병과 지방병형 소 류코시스의 경우 다른 질병들에 비해 국가 차원의 관리가 부족하였기에 감염 현황에 대한 정확한 조사 결과조차 없는 실정임. 본 과제는 두 질병에 대한 국내 감염 현황 조사를 실시하였으며, 각 지역에 따른 분포 또한 분석하였음. 이와 함께 현장 진단 또는 신속 진단 적용을 위해 기존에 수행되고 있던 진단법과 함께 새로운 진단방법에 대한 개발 및 적용을 수행함. 따라서 적용된 검사법을 현장에 맞도록 추가 개선한다면 신속한 검사가 가능하여 감염우 선별 및 질병 근절에 도움을 줄 수 있음. 이를 통해 국내 낙농가에 만연해있는 감염성 소모성 질병 근절에 도움이 될 수 있기에 그 기여하는 바가 크다고 할 수 있음.

○ 2-1세부

- 야생조류와 가금농장간의 병원체 순환경로 분석으로 방역대책 수립을 위한 기초자료 확보

○ 2-3세부

본 연구의 과정은 진드기의 사육부터 시작하여 진드기의 주요활성 유전자의 탐색과 함께 미래의 진드기 백신의 초석이 될 수 있는 항원을 특정 하는 연구까지 진행되어 진드기 매개 질병의 차단과 해당 질병의 발병을 사전에 차단할 수 있는 방역에 대한 개념을 제공하여 친환경적이면서도 경제적인 백신의 토대를 마련하였으며, 기존의 시판중인 백신보다 우월한 성과를 낸 새로운 백신의 토대를 특허출원하여 국내백신 산업에 큰 기여를 하였다고 판단됨

○ 3-2세부

1년차

- *Salmonella Gallinarum*의 야외주와 백신주 데이터 수집 기여
- *Salmonella Gallinarum* 야외주의 항생제 내성 프로파일 데이터 수집 기여
- *Salmonella Gallinarum* 야외주/백신주 감별 PCR 개발 및 이에 대한 적용성 검증

2년차

- 호흡기계 증상을 보이는 닭에서의 MS 검출을 데이터 수집 기여
- 한국에서 분리한 MS의 항생제 내성 프로파일 데이터 수집 기여
- 발명된 항생제 내성 진단 MAMA-PCR의 한국 분리주에 대한 적용성 검증
- Passage를 활용한 인위적으로 내성 MS 제작 필요성 성립.

3년차

- Passage를 활용한 인위적으로 제작한 항생제 내성 MS 제작 가능성 확인
- Oxytetracycline과 Tiamulin의 내성에 관여하는 MS의 유전자 확인
- Oxytetracycline과 Tiamulin 내성 진단 PCR 개발 및 이에 대한 적용성 검증

4년차

- 가금유래 *Salmonella*의 항생제 내성 정보를 확보함으로써 가축분야에서 사용하는 항생제와 분리되는 *Salmonella*의 항생제 내성 관계 확립.
 - 가금유래 *Salmonella*의 항생제 내성 유전자를 분석함으로써 가축분야에 존재하는 항생제 내성 유전자의 전파 가능성 검토
 - One Health적으로 가축분야에서 사용되는 항생제의 중요성 검토
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 1-1세부

- 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발로 양돈농가 질병피해 감소
- 개발한 신속진단 키트를 활용한 국내 양돈농가 발생 질병의 신속진단 · 치료전략 수립 및 이를 통한 양돈농가의 경제적 피해 예방
- 돼지 세균성 소화기계 감염병 질병의 조기 진단 및 예방/치료전략 수립을 통한 양돈산업의 생산성 증가

○ 1-2세부

- 돼지 번식기계 관련 감염병 관리 시스템의 활용
 - 번식관련 감염병 조기진단을 위해 구축된 프로토콜로 샘플링 실시 및 감염원 확인
 - 난모세포의 시험관내 성숙과정에서 감염원 및 사이토카인이 미치는 영향 연구
 - 확립된 돼지 배반포 유래 영양막줄기세포로부터 오가노이드 연구 수행이 가능함
- 돈사 관리의 효율성 극대화
 - ICT 돈사 관리 시스템으로 개체의 데이터, 예찰정보 데이터 등을 데이터베이스에 저장하여 데이터의 일관성, 무결성, 보안성 유지에 용이함.
- 빅데이터 구축을 통한 질병 발병 경로 예측
 - 수집된 개체 데이터 및 위치 데이터를 통하여 질병의 발병 경로가 예측이 가능하고, 더 나아가 질병 발병의 원인제공에 대한 데이터의 추출이 가능함.
- 통합 관제 시스템 구축
 - CCTV 데이터, 개체 관리를 통해 축적된 데이터베이스를 기반으로 예방접종, 질병 발생에 대한 통합 관제 기능을 제공할 수 있음

○ 2-1세부

- 주요 가금질병에 대한 신속진단법 개발 시 시료로서 활용

○ 2-3세부

본 연구의 성과는 관련분야의 산업체와 연관하여 대량생산을 할 수 있는 추가 연구와 관련 백신을 현장에 적용할 수 있는 연구를 진행할 예정임

○ 3-2세부

1년차

- *Salmonella* Gallinarum 야외주/백신주 감별 PCR 활용
- 한국 *Salmonella* Gallinarum 야외주의 항생제 내성 프로파일 활용

2년차

- 한국 MS 분리주의 항생제 내성 프로파일 활용
- 기존의 항생제 내성 진단 MAMA-PCR 활용
- Passage를 통해 Tetracycline과 Tiamulin 내성 MS 제작 계획

3년차

- Oxytetracycline과 Tiamulin에 대한 내성 진단 PCR 활용
- 다양한 항생제에 내성을 갖는 MS 제작 계획
- 항생제 내성 진단 PCR을 이용하여 fastidious 세균에서의 용이한 항생제 감수성 검사 가능성 확인

4년차

- 한국 가금 도체 유래 *Salmonella*의 항생제 내성 프로파일 활용
 - 가금 도체 유래 *Salmonella*의 전장유전체 확보 및 이를 활용한 유전 역학 분석 계획
-

○ 1-2협동

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	1
	비SCIE	
	계	1
특허출원	국내	1
	국외	
	계	1
특허등록	국내	
	국외	
	계	
	인력양성	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	
	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		

○ 2-3세부

< 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	
	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		

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품 기술융합 창의인재양성사업				
연구분야	동물감염병 분야			과제구분	단위
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발			과제유형	응용
연구개발기관	충북대학교 산학협력단			연구책임자	이완규
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	기타	계
	1차년도	2020.01.31.~2021.01.30	452,625	150,000	602,625
	2차년도	2021.01.31.~2022.01.30	452,625	120,000	572,625
	3차년도	2022.01.31.~2023.01.30	452,625	150,000	602,625
	4차년도	2023.01.31.~2024.01.30	452,625	150,000	602,625
	계		1,810,500	570,000	2,380,500
참여기업					
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023.03.05

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교 수의과대학	교수	이완규

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	이완규
----	-----

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품 기술융합 창의인재양성사업				
연구분야	동물감염병 분야			과제구분	단위
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	돼지 생식기계 감염병 관리 및 ICT 융합 동물감염병 관리시스템 개발			과제유형	응용
연구개발기관	충북대학교 산학협력단			연구책임자	현상환
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	기타	계
	1차년도	2020.01.31.~2021.01.30	322,375	50,000	372,375
	2차년도	2021.01.31.~2022.01.30	322,375	50,000	372,375
	3차년도	2022.01.31.~2023.01.30	322,375	50,000	372,375
	4차년도	2023.01.31.~2024.01.30	322,375	50,000	372,375
	계		1,289,500	200,000	1,489,500
참여기업	(주)터보소프트				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

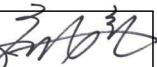
2. 평가일 : 2023.03.05

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교 수의과대학	교수	현상환

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	현상환 
----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품 기술융합 창의인재양성사업				
연구분야	동물감염병 분야			과제구분	단위
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				협동
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	가금 아데노바이러스 다가백신 개발 및 백신프로그램 작성			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	(주)중앙백신연구소			연구책임자	강신영
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.01.31. ~2021.01.30.	75,000	78,500	153,500
	2차년도	2021.01.31. ~2022.01.30.	75,000	78,500	153,500
	3차년도	2022.01.31. ~2023.01.30.	75,000	78,500	153,500
	4차년도	2023.01.31. ~2024.01.30.	75,000	78,500	153,500
	5차년도				
	계		300,000	314,000	614,000
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024. 3. 7.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)중앙백신연구소	고문	강신영

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

자체평가의견서

1. 과제 현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				
연구분야	동물감염병 분야			과제구분	단위
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				협동
총괄과제				총괄책임자	
과제명	젖소의 소모성 감염병의 청정화 방법 연구			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	서울대학교 산학협력단			연구책임자	김 단 일
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	20.1.31-21.1.30	150,000		150,000
	2차년도	21.1.31-22.1.30	150,000		150,000
	3차년도	22.1.31-23.1.30	150,000		150,000
	4차년도	23.1.31-24.1.30	150,000		150,000
	5차년도				
	계	48개월	600,000		600,000
참여기업					
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망


2. 평가일 : 2024.03.01

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교 수의과대학	교수	김단일

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품기술융복합 창의인재 양성 사업-교육훈련				
연구분야	동물감염병 분야		과제구분	단위	
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업			공동	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	국가재난형 진드기 매개질병 감염 방제를 위한 진드기 백신 항원 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구개발기관	전북대학교 산학협력단		연구책임자	유명조	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.01.31-2021.1.30	150,000	0	150,000
	2차년도	2021.01.31-2022.1.30	150,000	0	150,000
	3차년도	2022.01.31-2023.1.30	150,000	0	150,000
	4차년도	2023.01.31-2024.1.30	150,000	0	150,000
	5차년도				
계			600,000	0	600,000
참여기업					
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
전북대학교 산학협력단	교수	유명조

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품기술융합창의인재양성사업				
연구분야	동물감염병 분야			과제구분	단위
사업명	농식품기술융합창의인재양성사업				공동
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내 돼지생식기호흡기증후군 바이러스의 유전학적 및 면역학적 특성 분석			과제유형	기초
연구개발기관				연구책임자	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020-01-31 ~ 2021-01-30	520,000,000	-	520,000,000
	2차년도	2021-01-31 ~ 2022-01-30	520,000,000	-	520,000,000
	3차년도	2022-01-31 ~ 2023-01-30	520,000,000	-	520,000,000
	4차년도	2023-01-31 ~ 2024-01-30	520,000,000	-	520,000,000
	계	2020-01-31 ~ 2024-01-30	2,080,000,000	-	2,080,000,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024-03-19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 산학협력단	교수	류영수

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		320005-4	
사업구분	농식품기술융복합 창의인재 양성사업				
연구분야	동물감염병 분야		과제구분	단위	
사업명	농식품기술융복합 창의인재 양성사업			공동	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	(3-2세부)가금 호흡기 병원체 진단 및 분자역학 분석법 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구개발기관	건국대학교 산학협력단		연구책임자	이상원	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020/01/31~2021/01/30	150,000,000	-	150,000,000
	2차년도	2021/01/31~2022/01/30	150,000,000	-	150,000,000
	3차년도	2022/01/31~2023/01/30	150,000,000	-	150,000,000
	4차년도	2023/01/31~2024/01/30	150,000,000	-	150,000,000
	계	2020/01/31~2024/01/30	600,000,000		
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024/03/19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 산학협력단	교수	이상원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	이상원	
----	-----	---

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호			
사업구분	농식품기술융합창의인재양성사업				
연구분야	동물감염병 분야		과제구분	단위	
사업명	농식품기술융합창의인재양성사업			공동	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	인수공통전염병의 분자생물학적 진단 및 역학 연구		과제유형	기초	
연구개발기관	건국대학교 산학협력단		연구책임자	최인수	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020-01-31 ~ 2021-01-30	150,000,000	-	150,000,000
	2차년도	2021-01-31 ~ 2022-01-30	150,000,000	-	150,000,000
	3차년도	2022-01-31 ~ 2023-01-30	150,000,000	-	150,000,000
	4차년도	2023-01-31 ~ 2024-01-30	150,000,000	-	150,000,000
	계	2020-01-31 ~ 2024-01-30	600,000,000	-	600,000,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

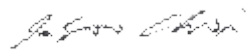
2. 평가일 : 2024-03-19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 산학협력단	교수	최인수

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

○ 1-1세부

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구를 통하여 국내 양돈 농가의 소화기계 감염병 발생현황 및 감염실태를 파악할 수 있었으며, 돼지 세균성 소화기계 감염병 방제 대책 수립을 위한 기초자료를 확보할 수 있었음. 특히 돼지 소화기계 감염병을 빠른 시간 내에 진단할 수 있는 신속진단 검출기법을 개발하여, 소화기계 감염병 5종 원인체 (*pathogenic E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Lawsonia intracellularis*)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하여 국내 양돈 산업의 질병으로 인한 생산성 저하를 예방하는 데에 큰 기여를 하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

돼지 소화기계 감염병은 환돈의 폐사로 인한 직접적인 피해와 성장지연 등의 간접적인 피해를 일으키기 때문에 양돈산업에서 생산성 저하의 중요한 원인이다. 그러나 소화기계 감염병은 병원체, 숙주의 면역 및 사양 관리 간의 상호작용에 의한 발생으로 진단과 예방이 어려운 상황이다. 따라서 국내 양돈장에서 발생하는 중요한 세균성 소화기계 감염병 원인체의 특성 조사 및 감염 실태를 조사하고, 분리균에 대한 병원성 인자 및 분자생물학적 특성 조사 결과를 바탕으로 양돈농가에 적용 가능한 신속진단검출 키트를 개발하는 것은, 양돈 농가 질병피해 감소에 크게 기여함은 물론 국가 가축전염병 방역 측면에서도 매우 큰 파급효과가 있을 것으로 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발의 연구개발 과정을 통하여 얻어진 연구개발결과는 향후 특허출원, 기술이전, 진단키트개발 등 다양한 분야에서 활용가능성이 높다고 판단됨. 특히 4차년도 연구를 통하여 개발한 소화기계 감염병 5종 원인체 신속진단 검출키트는 기존의 양돈현장에서 사용하는 임상병리학적 방법과 세균학적 검사와 다르게 환돈의 생존과 관계없이 미량의 시료에서도 질병을 정확하고 신속하게 진단할 수 있어, 보균돈 색출 및 조기 도태 유도로 질병 전파를 미리 방지할 수 있는 효과가 있으며, 향후 특허출원과 기술이전을 통해 산업화 활용 가능성이 매우 높을 것으로 기대됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

돼지 세균성 소화기계 감염병 특성 조사 및 진단법 개발의 연구개발 과정을 통하여 달성 목표 중 SCIE 논문 7건 대비 28건, 기술실시 2건 대비 4건, 고용창출 4건 대비 13건, 홍보전시 7건 대비 13건, 인력양성(일반) 2건 대비 5건 및 인력양성(특수) 3건 대비 4건으로, 대부분의 달성 목표를 초과달성하는 연구성과를 얻었음. 따라서 연구과제 성과달성을 위하여 성실하게 연구개발과정을 진행하였다고 판단됨. 또한 양돈 전문 수의사와 협업하여 500개 이상의 양돈 농가를 대상으로 시료채취 및 지속적인 유전자원 확보를 통하여 국내 양돈농가의 소화기계 감염병 원인체의 특성을 조사하였으며, 소화기계 감염병 5종 원인체 (*pathogenic E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Lawsonia intracellularis*)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하는 성실한 연구수행 노력을 보였다고 자부하고 있음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

국내 돼지 소화기계 감염병 원인체의 발생 현황에 대한 논문 32건, 생명자원 6건, 기술실시 4건, 고용창출 13명, 일반 인력양성 5건, 특수 인력양성 4건 등의 목표를 달성하였음.

○ 1-2세부

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구는 ICT 기술과 생명공학의 융합을 통해 돼지 번식계통 감염병 관리를 위한 혁신적인 시스템을 확립하였습니다. 또한 돼지 생산성 향상을 위해 난모세포의 체외 성숙 및 번식과 관련된 사이토카인 인자들의 역할을 규명하고, 번식계통 감염병을 진단하는 분자생물학적 시스템의 연구도 진행되었습니다. 최종적으로, 농가에서의 실제 적용을 위한 ICT 기반 돈사 관리 시스템의 고도화와 프로그램 사용 편리성을 증대시켜, 농장 관리자들의 효율성을 크게 향상시켰습니다. 이러한 연구개발 결과는 동물 복지 및 생산성 향상에 기여할 뿐만 아니라, 질병 관리와 관련한 사업적 접근에 있어 새로운 기반을 마련하였습니다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구의 성과는 농장 운영의 효율성 증진은 물론, 질병 관리에 대한 사업적 접근의 혁신을 가능하게 하여 축산업의 생산성과 동물 복지를 증진할 수 있는 기반이 될 것입니다. 또한, 본 연구 결과가 도출한 데이터와 프로토콜은 동물전염병의 예방 및 대응 전략 수립에 중요한 역할을 할 것으로 기대되며, 이는 궁극적으로 축산업의 지속 가능한 발전과 공중 보건 향상에 기여할 것입니다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구는 돼지 번식계통 감염병 관리와 관련된 고도의 ICT 돈사관리 시스템 구축에 성공하였으며, 이는 전염병의 예방과 조기 대응에 필수적인 데이터를 수집 및 분석하는 새로운 프로토콜을 제공합니다. 이러한 시스템은 번식계통뿐만 아니라 다양한 감염병에 대한 새로운 예방 및 치료법의 개발, 그리고 축산업에서의 동물 복지 향상에 기여할 수 있는 방대한 응용 가능성을 내포하고 있습니다. 더 나아가, 안정적인 데이터 관리 및 실시간 모니터링 시스템의 실용화가 이루어진다면, 효율적인 축산 관리와 질병 예방을 위한 새로운 해결책이 제시될 것이라 기대됩니다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구팀은 계획된 연구 목표에 따라 체계적인 샘플링 방법의 확립, 난모세포의 체외 성숙시스템 개선, 감염병의 분자생물학적 진단법 연구, 그리고 ICT 기반 돈사 관리 시스템의 개발 및 통합과 같은 다양한 과제들을 성공적으로 완수하였습니다. 특히, 연구팀은 데이터 관리의 효율성을 개선하고 실시간 모니터링을 가능하게 하는 돈사관리 시스템을 개발함에 있어 지속적으로 노력하였습니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구를 통하여 총 11편의 SCIE 학술논문 및 16건의 각종 국내외 학술대회 발표, 4건의 특허출원 및 1건의 특허등록, 8건의 우수학술 수상 성과를 도출했습니다.

○ 1-1협동

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

4년이라는 연구개발기간 내 본 백신 필요성의 근거가 되는 연구활동(논문 게재), 균주 선발 등의 백신 개발 및 품목허가, 매출 발생 성과까지 달성하였음.
이는 일반적인 동물용 백신 개발 기간과 비교하면 빠른 기간내에 우수한 성과를 달성하였다고 할 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

현재 국내 가금 아데노바이러스 백신 시장에서 경쟁제품들은 모두 단일 및 2가 백신만 존재하는 상황임.
또한, 국내 가금 아데노바이러스 발생 현황은 4형, 8b형, 11형의 3종 혈청형이 혼재되어 발생하고 있으며 이들 혈청형간 교차방어능은 인정되지 않고 있음.
이러한 상황에서 본 연구과제의 결과물인 “포울샷® 아데노 3가”는 현재 국내에 발생하고 있는 가금 아데노바이러스의 모든 혈청형을 방어할 수 있는 유일한 제품으로 그 파급효과는 매우 크다고 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

가금 아데노바이러스는 국내뿐만 아니라 해외, 특히 아시아 및 중동에서도 문제가 되고 있는 질병이며, 문제가 되고 있는 대부분의 국가에서 유행하는 혈청형은 4형, 8b형, 11형이 대부분임.
또한, 가금 아데노바이러스는 각 혈청형 내에서의 유전자 상동성이 높은 편이며 중화항체가와 방어능의 상관성도 높음.
따라서 본 연구과제의 결과물인 “포울샷® 아데노 3가”는 해외시장으로의 수출 가능성이 높다고 판단됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

동물용의약품 중 생물학적제제인 백신의 경우 일반적으로 제품 개발 및 허가에 걸리는 기간이 길지만, 4년의 연구개발 기간내에 제품 허가는 물론, 매출까지 발생하는 성과를 달성
품목허가에만 그치지 않고 본 백신의 필요성을 뒷받침하는 연구논문, 런칭세미나 및 각 지역 대리점 세미나 등을 통해 향후 지속적인 매출발생을 위해 노력 중

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, **보통**, 미흡, 극히 불량)

임상 및 마케팅적으로도 활용도가 높은 국내 가급아데노바이러스 발생현황에 대한 논문, 국내외 학술대회 발표 및 특허 등록(1건)의 성과가 있었고, 본 백신의 출시 시점에 런칭세미나를 개최하기도 하였지만 목표 대비 부족한 부분은 있음

○ 1-2협동

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

낙농 농가의 생산성을 저하시키는 감염성 소모성 질병 실태에 대한 조사를 실시하였고, 이러한 질병의 정확한 질병이 가능한 검사 방법을 확인함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

요네병 및 류코시스의 일차적인 현장 진단에 도움이 될 수 있는 진단법에 대한 확인을 하였으며, 이를 바탕으로 목장과 지역동물병원을 통해 감염우의 일차적인 선별이 가능할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

요네병균 miRNA 진단법을 이용하여 요네병에 대한 진단 기술 향상

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히 불량)

과제 기간 내 전염병(구제역, 럼피스킨) 발생으로 연구 수행에 어려움이 있었음에도, 최초 계획된 정량 성과 계획의 대부분을 달성함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : **우수**, **보통**, 미흡, 극히 불량)

SIE급 저널에 3편의 논문 게재가 있었고, 11편의 학술발표를 수행함. 이는 당초 계획되었던 학술 발표 6건에 비해 초과달성한 결과임. 또한 1건의 특허를 출원함.

○ 2세부

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우○수, 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구는 진드기의 인공사육을 통하여 얻어진 유전자를 활용하여 진드기 백신의 주요항원을 찾는 연구로서 방역과 관련하여 진드기의 위험성은 많은 연구 보고서에서 지적하고 있듯이 많은 병원체를 매개하는 것으로 알려져 있고 그것은 많은 논문을 통하여 확인되었다. 그런 관점에서 진드기 백신은 진드기 매개 병원체의 차단을 위한 기본 자료를 제공하는 우수하면서도 창의적인 연구라고 사려됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우○수, 보통, 미흡, 극히 불량)

세계적으로 활용되고 있는 진드기 백신인 Tick Guard를 대체할 수 있는 중요한 경제적 가치 및 환경친화적인 연구로서 그 파급효과는 미래의 진드기 백신연구에서 백신 생산을 위한 기초자료로 활용할 수 자료로서 그 파급효과는 크다고 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우○수, 보통, 미흡, 극히 불량)

살충제의 오남용으로 인한 육류 내 잔류 문제, 환경오염, 내성을 지닌 진드기의 증가 등의 문제를 극복할 수 있는 새로운 백신에 대한 기반 구축을 위한 기반 자료로서 활용이 가능하다고 사려됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우○수, 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구는 진드기의 인공적인 배양을 통하여 관련 유전자의 채취와 이를 활용한 생리활성유전자의 동정을 통하여 미래의 진드기 백신의 항원이 될 가능성이 높은 항원을 특허 출원이라는 결과를 도출하여 연구는 수행에서 결과까지 성실히 수행되었다고 사려됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우○수, 보통, 미흡, 극히 불량)

본 연구는 진드기의 인공적인 배양을 통하여 얻어진 결과를 통하여 백신 후보가 되기 까지 논문과 지적소유권인 특허의 출원 및 학회의 발표를 통하여 성실히 수행되었으며 개발 성과는 우수하다고 사려됨.

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

○ 3-1세부

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

PRRSV에 대한 진단과 치료 방법 개발을 위해 돼지 IL-2 유전자 삽입을 통한 폐 병변 재현, 항체 라이브리리를 통한 미끼항체와 중화항체의 형성 과정 분석, 그리고 hypo-glycosylated chimeric DIVA 바이러스의 개발 등을 진행하며 PRRSV 감염에 대한 효과적인 대응에 대해 기여함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

미끼 항원 결정부(decoy epitope)의 위치 및 미끼 항체(decoy antibody) 연구는 중화 항체를 충분히 유도할 수 있는 백신 연구의 기반이 됨.

미끼 항원 결정부(decoy epitope)에 관한 연구 결과를 통해 자연감염 시에만 나타나는 항원 결정부(epitope)를 특정할 수 있을 것으로 기대함

상기 연구 결과를 활용하면 DIVA기술을 완성할 수 있으며 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 방역 기술의 한 단계 진보라고 볼 수 있음.

PRRSV 항체의 친화력 증강 과정을 확인한다면 PRRSV가 가진 항원 결정부를 확인

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

PRRSV 미끼 항체 및 중화항체를 합성할 수 있다면, 미끼항체 및 중화항체를 필두로 한 PRRSV로 인해 나타나는 질병에 대한 치료제로 사용될 수 있을 것으로 사료

Peptide ELISA를 통해 항원 항체 반응성의 증감을 확인한다면, DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) vaccines and strategies 중 하나로 사용하여 PRRSV 백신 개발의 지표로 사용될 수 있다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

초기에 설정한 목표에 근거하여 근접하게 성과를 달성하였으며 그에 대한 정량 및 정성 성과를 증빙함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통

2건의 특허 출원, 1건의 기술 이전, 1건의 국외 학술발표, 5건의 논문 발표 등 연구결과에 대한 다양한 개발 성과를 발표하였음.

○ 3-2세부

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

국내 닭에서 *Salmonella* sp.와 *Mycoplasma* sp.를 분리하였으며 이에 대한 항생제 내성 정보와 유전체 정보를 확보함. *Salmonella* Gallinarum의 감별진단 PCR primer를 개발하고 *Mycoplasma*의 항생제 내성 진단용 PCR primer를 개발함. 그 외 성과에 대해서는 논문 및 특허 등으로 정량적으로 증빙함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구팀에서 확보한 *Salmonella*와 *Mycoplasma*의 prevalence, 항생제 내성 정보, 유전체 정보는 항생제 내성 발현율과 역학 조사에서의 파급 효과를 기대할 수 있음. 또한, 본 연구팀이 개발한 감별진단 PCR과 항생제 내성 진단용 PCR을 통해서 더 간편하고 빠른 검사를 통해서 올바른 감별진단 및 항생제 사용을 기대할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

prevalence, 항생제 내성 정보, 유전체 정보를 기반으로 국내외 역학관계 조사, 항생제 내성 발현율 변화, 항생제 관련 정책 보완 등의 연구로 이어갈 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

초기에 설정한 목표에 근거하여 성과를 달성하였으며 정량 및 정성 성과를 통해 이를 증빙함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구팀은 논문 3편, 특허 출원 2건, 학술발표 1건 등의 연구개발성과를 달성함.

○ 3-3세부

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

국내에서 돼지 및 말에서의 HEV를 포함한 다양한 바이러스를 분리하였으며, 그 결과를 National Library of Medicine (NCBI) 데이터베이스에 등록함. 그 외 성과에 대하여 논문 및 특허 등의 정량적으로 증빙하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 보통

본 연구진에서 분리한 바이러스의 서열은 타 연구에 응용되어 바이러스의 역학 조사에 파급효과를 기대할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

다양한 바이러스의 유전자 분석을 통하여 국내외 역학관계 조사 및 바이러스의 변이, 진화를 추가적으로 연구할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

초기에 설정한 목표에 근거하여 성과를 달성하였으며 그에 대한 정량 및 정성 성과를 증빙함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

3건의 국내 외 학술발표, 1건의 특허 출원, 3건의 홍보실적, 1건의 포상 실적 등 연구결과에 대한 다양한 개발 성과를 발표하였음.

II. 연구목표 달성도

○ 1-1세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
돼지 세균성 소화기계 감염병 원인체 특성조사 및 분리주 유전자원 확보	20	100	국내 양돈 약 500농가 대상 대장균, 살모넬라 등 약 760여 균주의 미생물학적 특성 조사 및 주요 병원성 원인체의 항생제 감수성 및 내성인자 특성조사를 완료하고, 분리주에 대한 유전자원 확보를 완료하였음.
주요 병원성 원인체의 항원 및 병원성 유전자 검색을 통한 분자생물학적 특성 조사	20	100	국내 양돈농가 유래 병원성 대장균의 부착인자, 독소산생 유전자 분석 및 유전학적 상동성 비교분석을 통하여 국내 우세 병원성 균주는 높은 유전학적 근연관계를 보이는 분자생물학적 특성을 확인함.
분자생물학적 기법을 이용한 소화기계 감염병 원인균 신속진단검출기법 개발	30	100	세균성 돼지 소화기계 감염병 진단을 위한 특이적 primer를 제작하여, Multiplex PCR법을 이용한 신속진단검출기법을 개발하였으며, 국내 분리주를 이용한 교차반응 검사를 통하여 유용성을 확인함.
돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발	30	100	신속진단 기법 개발 및 이를 활용한 돼지 소화기계 감염병 5종 원인체 (pathogenic <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> 및 <i>Lawsonia intracellularis</i>)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하였으며, 현장진단 적용시험을 통해, 신속진단 키트가 현장에서 즉시 적용이 가능함을 확인하였음.
합계	100점	100	

○ 1-2세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 설계		100	- 목표 시스템은 소프트웨어 개발 방법론을 선정하고 개발 방법론에 의거하여 요구사항 분석, 사용자 인터페이스(사용자 화면) 설계, 데이터베이스 설계를 진행하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 구축		100	-농가별 생육환경, 축산시설 출입 차량의 GPS 좌표 등의 실시간 수집을 위한 IoT센서 데이터 활용기반 기능 개발하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 고도화		100	- ICT 돈사관리 시스템v1.1을 이용하여 데이터 수집 및 보관 뿐만 아니라, 농가전체의 온도나 습도 등을 모니터링하는 IoT 센서 데이터를 추가 개발하여 기후, 발병 등의 문제 발생을 최소화하고, 전반적 돈사 관리의 편리성을 증대하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 안정화		100	-돈사 관리 프로그램을 통하여 다수의 축사 내에 시스템을 납품하여, 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 데이터화를 진행하였음 -향후 프로그램 커스터마이징을 통하여 축사 이외에 적용할 수 있는 관리 프로그램 구축 예정임
합계	100점		

○ 1-1협동

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 최근 국내 가금 아데노바이러스 발생현황 조사 ○ 선발된 백신 후보주를 이용한 시험백신의 생산	35	100	최근 국내 가금 아데노바이러스 발생현황 관련 논문 작성 완료 시험백신 생산 완료
○ 아데노 다가백신의 실험실 내 평가 ○ 임상시험계획서 작성 및 임상시험 승인	30	100	아데노 다가백신 시험백신을 이용한 실험실 내 평가 및 임상시험 승인 완료
○ 아데노 다가백신의 야외임상시험 진행	20	100	아데노 다가백신 야외임상시험 진행 완료
○ 아데노 다가백신의 백신 프로그램 개발 및 품목허가	15	100	아데노 다가백신 품목허가 완료
합계	100점		

○ 1-2협동

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 젖소에서 요네병 발생 현황 조사	20	100	목표 달성
○ 젖소에서 류코시스 발생 현황 조사	20	100	목표 달성
○ 요네병 진단법 개발 및 확립	20	100	목표 달성
○ 현장단계에서의 류코시스 진단 체계 확립	20	100	목표 달성
○ 국내 소모성 감염병에 대한 현황 및 진단체계 확립	20	100	목표 달성
합계	100점		

○ 2세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<i>H. longicornis</i> 의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색	25	100	<i>H. longicornis</i> 의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 3건의 유용 유전자의 탐색
각 단계별 진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 탐색	25	100	진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 각 단계별 탐색
재조합 유전자의 전염병에 대한 면역 성장검사	25	100	재조합 유전자를 활용한 진드기 매개 질병에 대한 효능 검증을 수행함
생리활성단백질의 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증	25	100	선발된 생리활성단백질인 에놀라제를 활용한 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증
합계	100점		

○3-1세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
PRRSV 감염성 클론에 돼지 IL-2 유전자를 클로닝 기법으로 삽입	10	100	클로닝 기법을 이용하여 ORF1b와 ORF2 유전자 사이 공백에 돼지 IL-2 유전자 삽입 완료
재조합바이러스, 대식세포와 수지상세포를 이용한 폐 병변 재현	10	100	TGB, INF 등 사이토카인 분석을 통한 병변 발현 인자 확인
돼지접종실험을 통한 폐 병변 발생 원리 증명	10	100	4주령 돼지에서 추출한 말초 혈액 단핵세포 군에 돼지 인터류킨2 발현 물질을 첨가한 후 변화를 관찰하였으며, 그 결과 T 세포와 B 세포 군집의 증가 확인
PRRSV 동물 접종을 통해 미끼항원결정부에 대한 항체 라이브러리 확보	10	100	PRRSV 중 K148과 K418DM 접종을 통해 얻어낸 hybridoma에서 항체 라이브러리 확보 완료.
NGS 기법을 이용한 항체 라이브러리 분석	10	90	NGS 항체 라이브러리 분석
항체 분광형 분석을 통한 미끼항체 서열 확인	10	90	항체 분광형 분석을 통한 미끼항체 서열 확인
돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 확인	20	100	돼지를 이용한 in vivo 실험 결과 peptide ELISA를 통한 항체 형성에 대한 평가는 O1m15 peptide antigen을 사용한 peptide ELISA 실험결과로 항체의 친화력 증강 (affinity maturation) 과정 확인할 수 있음.
돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 미끼 항체 및 중화항체 합성	10	100	돼지를 이용한 in vivo 실험 결과, hypo-glycosylated chimeric diva virus가 임상증상, 체온, ADWG, viremia level 상에서 병원성이 없고 안전함을 확인함. Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus 접종군은 1:8 이상의 높은 중화항체를 나타내어 미끼 항체 및 중화항체를 확보.
돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 ORF7 항원 결정부 확인	10	100	Hypo-glycosylated chimeric DIVA virus는 DIVA를 형성하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 항체의 ORF7의 항원 결정부를 확인할 수 있음.
합계	100점	98	

○3-2세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<i>Salmonella</i> Gallinarum 야외주 및 백신주 유전체 정보 확보	10	100	<i>Salmonella</i> Gallinarum 순수 야외분리주 7종 및 백신주 1종 균주 자원을 확보하고 이들의 유전체 정보를 확보함
<i>Salmonella</i> Gallinarum 야외주/백신주 감별진단 PCR primer 개발	10	100	<i>Salmonella</i> Gallinarum 9R 백신주에 대한 감별 진단 primer를 제작함
개발한 <i>Salmonella</i> Gallinarum 감별진단 PCR primer 효능 검증	5	100	개발한 감별진단 primer를 사용하여 <i>Salmonella</i> Gallinarum 야외분리주와 백신주의 감별진단을 진행하고 이를 검증함
<i>Mycoplasma synoviae</i> / <i>Mycoplasma gallisepticum</i> 야외주 확보 및 유전체 정보 확보	10	50	<i>Mycoplasma synoviae</i> 순수 야외분리주 4종 및 백신주 2종 균주 자원을 확보하고 이에 대한 유전체 정보를 확보함. 국내 시료 중에 <i>Mycoplasma gallisepticum</i> 이 검출된 시료가 존재하지 않았기에 <i>Mycoplasma gallisepticum</i> 의 분리는 진행하지 못함.
국내 <i>Mycoplasma</i> sp. 항생제 내성 프로파일 데이터 확보	10	100	국내 야외 <i>Mycoplasma synoviae</i> 분리주의 MIC를 포함한 항생제 내성 데이터를 확보함.
<i>Mycoplasma</i> sp. 항생제 내성 진단용 PCR 검증	5	100	<i>Mycoplasma synoviae</i> 항생제 내성 진단용 PCR을 진행하고 이의 결과를 MIC 결과와 비교하여 검증함.
Oxytetracycline/Tiamulin 내성 <i>Mycoplasma synoviae</i> 제작	10	50	계대배양을 통해 Oxytetracycline에 내성을 갖는 균주를 제작함. 계대배양을 계속해서 진행해도 Tiamulin에 내성을 갖는 <i>Mycoplasma synoviae</i> 는 제작되지 않음.
Oxytetracycline/Tiamulin 내성 <i>Mycoplasma synoviae</i> 유전체 정보 확보	5	100	Oxytetracycline 내성 <i>Mycoplasma synoviae</i> 에 대한 전장유전체를 확보함.
Oxytetracycline/Tiamulin 내성 진단용 PCR primer 개발	10	100	전장유전체 비교 분석을 통해 Oxytetracycline 내성 유전자 진단용 PCR primer를 제작함.
Oxytetracycline/Tiamulin 내성 진단용 PCR primer 검증	5	100	닭 도체 유래 살모넬라 38종을 확보함.
가금 도체 유래 <i>Salmonella</i> 균주 확보 및 항생제 내성 프로파일 데이터 확보	5	100	확보한 닭 도체 유래 살모넬라 38종의 MIC를 포함한 항생제 내성 데이터를 확보함.
다제내성 가금 도체 유래 <i>Salmonella</i> 유전체 정보 확보	10	100	항생제 다제내성 살모넬라 33종에 대해서 유전체 데이터를 확보함.
다제내성 가금 도체 유래 <i>Salmonella</i> 항생제 내성 유전자 확보	5	100	유전체 데이터 분석을 통해서 다제내성 가금 도체 유래 살모넬라가 보유한 항생제 내성 유전자의 현황 데이터를 확보함.
합계	100점	90점	

○3-3세부

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
돼지 분변으로부터 바이러스 유전체 추출 및 확보	20	100	양돈 농장에서 분변 시료를 채취하여 HEV 바이러스를 확보함
중합효소 연쇄반응을 통해 유전체 검출 비율 확인	10	100	적절한 PCR 조건을 확인하여 국내 검출 비율을 확인함
확보된 유전체의 유전자 염기서열 분석	10	100	시퀀싱 프라이머를 제작하여 부분 및 전장 유전자를 확보함
각 Open Reading Frame 별 유전자 염기 서열 분석하여 발현될 단백질의 특성 파악	10	100	Capsid 유전자를 SF9 baculovirus 시스템을 활용하여 확인하였음
유전체의 염기서열 분석 결과와 국내외 검출된 유전체의 염기서열과 비교 분석	10	100	국내외에서 검출된 바이러스 유전체의 염기서열과 비교하여 계통분석을 진행하였음
계통분석을 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인	20	100	국내외에서 검출된 바이러스 유전체 염기서열을 이용하여 phylogenetic analysis를 통해 국내 분리주의 유전자형과 아류형 확인
확보된 유전자를 클로닝을 통해 항원 생산	10	100	Capsid gene을 cloning 후 발현벡터에 삽입하여 capsid protein을 발현시켜 항원 생산
생산된 항원으로 단일클론항체 생산	10	80	생산된 항원을 마우스에 주입하여 항체가를 확인하였으나 효과적인 분리는 연구중에 있음.
합계	100점	98	

III. 종합의견

○ 1-1세부

돼지 소화기계 감염병은 환돈의 폐사로 인한 직접적인 피해와 성장지연 등의 간접적인 피해를 일으키기 때문에 양돈산업에서 생산성 저하의 중요한 원인이다. 그러나 소화기계 감염병은 병원체, 숙주의 면역 및 사양관리 간의 상호작용에 의한 발생으로 진단과 예방이 어려운 상황이다. 본 연구를 통하여 국내 양돈농가의 소화기계 감염병 발생현황 및 감염실태를 파악할 수 있었으며, 돼지 세균성 소화기계 감염병 방제대책 수립을 위한 기초 자료를 확보할 수 있었다. 특히 돼지 소화기계 감염병을 빠른 시간 내에 진단할 수 있는 신속진단 검출기법을 개발하여, 소화기계 감염병 5종 원인체 (pathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Brachyspira hyodysenteriae* 및 *Lawsonia intracellularis*)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하여 국내 양돈산업의 질병으로 인한 생산성 저하를 예방하는 데에 큰 기여를 할 것으로 생각되며, 국가 가축전염병 방역 측면에서도 매우 큰 파급효과가 있을 것으로 기대된다.

○ 1-2세부

본 연구는 ICT 기술과 생명공학의 결합을 통해 돼지 번식계통 감염병 관리와 관련된 중요한 연구 결과를 달성하였습니다. 이러한 결과는 축산업의 생산성 향상, 질병 관리의 혁신, 그리고 동물 복지 개선에 크게 기여할 수 있는 잠재력을 가지고 있으며, 축산업 분야와 공중 보건에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대됩니다.

○ 1-1협동

1-1 협동 세부과제의 가장 주요 목표인 가금 아데노바이러스 다가백신 개발 및 품목허가를 성공적으로 수행하였음

또한 품목허가에만 그치지 않고 실제적으로 매출이 발생하는 성과를 달성함

다만, 일부 연구기반지표(논문 건수)와 사업화지표(매출액)에서 부족한 성과가 있었지만, 통상적인 동물용 백신 개발 기간과 비교하면 빠른 기간내에 우수한 성과를 달성하였다고 할 수 있음

○ 1-2협동

현재까지 젓소 목장의 큰 경제적 손실을 유발하는 국내 소모성 감염병에 대해 국가적 관리가 잘 이루어지지 않고 있었음. 따라서 이러한 질병이 국내에 얼마나 만연해있는지, 어떻게 진단해야 하는지에 대한 연구 결과도 미비함. 이번 연구를 통해 국내의 류코시스와 요네병 발생 현황을 확인하였으며, 진단법에 대한 개발을 실시하였음. 또한 국내 요네병균에 대한 유전자 분석을 실시하여 진단에 유용한 miRNA 유전자형을 검출해냄으로써 요네병 진단법을 마련함. 또한 현장 기반의 류코시스 진단이 가능하도록, 다수의 양성과 음성 샘플을 이용하여 다양한 검사법에 대한 비교 분석을 실시함. 이를 통해 3건 이상의 SCIE급 논문과 11편의 학술 발표 등의 성과를 창출함.

○ 2세부

본 연구는 우리나라에 우점종으로 분포하는 작은소참진드기의 감병병매개에 따른 질병의 차단 및 방제를 위한 기초연구로서 세계적으로 생산되며 판매되고 있는 Tick Guard라는 상업적 진드기 백신을 대체하면서 진드기 매개 감염병을 차단 및 방제하기 위한 연구이면서, 세계적으로는 선진국을 중심으로 환경 친화적인 진드기 방제대책에 대한 연구를 통하여 살충제의 남용에 따른 문제를 해결하기 위하여 세계적으로 활발하게 진행되는 연구의 한 분야로서, 환경적으로 안전하면서 질병의 차단에 대한 파장효과가 크다고 판단되는 연구이다.

○ 3-1세부

본 연구과제를 통하여 국내에서 유행하는 PRRSV에 대한 치료법의 개발에 기여하였으며 이에 대한 정보를 특허 출원 및 기술 이전을 진행함으로써 PRRSV 질병 대응에 기여했음. 이를 활용하여 돼지 산업에서의 PRRSV 감염에 대한 효과적인 대응을 위한 중요한 기반이 될 것으로 기대됨.

○ 3-2세부

본 연구과제를 통하여 국내에서 유행하는 가금류 세균성 질병의 병원체를 확보하였으며 이에 대한 유전체 정보들을 확보함. 또한, 이들을 사용하여 *Salmonella Gallinarum* 감별진단 PCR이나 *Mycoplasma synoviae* 내의 Oxytetracycline 내성 진단용 PCR을 개발하여 더 빠른 진단이 가능해졌기에 국내 가금 농장내에서의 경제적 손실을 완화할 수 있을 것으로 사료됨. 가금 도체 유래 살모넬라의 항생제 내성 프로파일을 확보함으로 인해서 항생제 내성 발현을 방지하는 항생제 사용 방법에 대한 고찰이 가능하게 됨. 추후 데이터를 추가하여 더 정확한 발현율 분석, 역학 조사, 현재 항생제 사용 방법의 보안 할 수 있는 후속 연구가 진행되어야 함.

○ 3-3세부

본 연구과제를 통하여 국내에서 유행하는 인수공통전염 바이러스를 확보하였으며 이에 대한 정보를 온라인 데이터베이스에 발표함으로써 바이러스의 역학조사에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

이를 활용하여 발현한 단백질의 경우 산업화를 위한 추가적인 연구가 필요하여 순수한 항체의 정제부터 시작하여 시제품 개발을 위한 후속 연구가 진행되어야 함.

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 1-1세부

본과제는 창의인재양성사업과제로서 4년 전 출범하여, 충북대학교가 주관기관으로서 특수대학원인 수의방역대학원을 설립하고, 매년 10명의 석사과정 학생을 입학시켜 5-6학기 과정의 석사과정 교육을 진행하는 교육과정을 진행하였기 때문에, 이 과제는 단순한 R&D 연구과제가 아니고, 교육과 연구가 함께 진행되었던 특수성이 있었음을 평가시 반드시 고려해 주기 바람. 현재 4년간의 연구과제는 종료되어 최종보고서를 제출하고 있지만, 수의방역대학원의 석사 과정 재학생들은 계속 수업과 논문작성 등의 인재양성 교육과정이 진행되고 있음. 따라서 원래 국가가 계획하였던 수의방역전문가 양성이라는 목표가 중단없이 진행될 수 있도록 일정 기간 수의방역대학원의 장학금 지급이나 운영비 보조 등의 국가적 추가지원사업이 진행되기를 요구함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 1-1세부

돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발의 연구개발 과정을 통하여 얻어진 연구개발 결과는 향후 특허출원, 기술이전, 진단키트개발 등 다양한 분야에서 활용가능성이 높다고 판단됨. 특히 4차년도 연구를 통하여 개발한 소화기계 감염병 5종 원인체 신속진단 검출키트는 환돈의 생존에 관계없이 미량의 시료에서도 질병을 정확하고 신속하게 진단할 수 있어, 보균돈의 색출 및 조기도태 유도로 질병전파를 미연에 방지할 수 있는 효과가 있으며, 향후 특허출원과 기술이전을 통해 산업화 활용 가능성이 매우 높을 것으로 기대됨.

○ 1-2세부

본 연구에서 개발된 체계적인 샘플링 방법과 ICT 기반 관리 시스템은 다른 축산업 분야로의 확장이 가능하며, 이는 국내외 다양한 축산 환경에 적용될 수 있는 기술의 표준화 및 보급을 촉진할 수 있습니다. 또한, 이러한 시스템의 적용은 아프리카돼지열병이나 렘피스킨병 같이 예상하지 못한 가축전염병 발병 시 신속한 대응과 효과적인 관리 전략 수립에 크게 기여할 것으로 예상됩니다.

향후 조치로는 개발된 시스템의 지속적인 업데이트와 유지관리가 필수적이며, 추가적인 기능 개발 및 사용자 피드백을 통한 편의성 향상이 추진되어야 합니다. 이를 통해 축산업의 지속 가능한 발전과 공중 보건의 개선에 기여할 수 있을 것으로 기대됩니다.

○ 1-2협동

이번 연구 결과를 바탕으로 소모성 감염병에 대한 특허를 출원할 예정이며, 국내 질병 현황에 대한 보고 예정. 이러한 연구 성과는 추후 국내 감염병 진단 체계 확립에 도움이 될 것으로 기대함.

○ 2세부

진드기의 생물활성유전자를 활용한 진드기 매개 감염병의 예방 및 방제를 위한 백신의 지속적인 현장 적응연구를 통한 감염병 방제 및 예방 및 효과의 극대화를 위해 산업계와 연계한 특허의 활용 및 생산에 대한 연구가 필요함.

○ 3-1세부

확보된 데이터에 의거하여 DIVA 백신 또는 PRRSV에 대한 치료제 개발 등 산업화할 수 있는 연구가 필요할 것으로 사료됨.

○ 3-1세부

확보한 데이터를 이용하여 현재 국내에 존재하는 *Salmonella Gallinarum*의 감별진단과 *Mycoplasma synoviae*의 항생제 내성 진단을 통해 더 많은 데이터 확보가 필요함. 또한, 가금 도체 유래 살모넬라의 데이터를 지속적으로 확보하여서 항생제 사용 방법의 개선 방안에 대한 제시도 필

요함.

○ 3-1세부

확보한 데이터에 근거하여 동물용의약품 백신 및 진단 키트 개발 등 후속적인 산업화 연구가 필요함

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	동물감염병 분야	
연구과제명	돼지 세균성 소화기계 감염병 특성조사 및 진단법 개발			
주관연구개발기관	충북대학교 산학협력단		주관연구책임자	이완규
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,810,500		570,000	2,380,500
연구개발기간	2020.01.31.~2024.01.30			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 돼지 세균성 소화기계 감염병 원인체 특성조사 및 분리주 유전자원 확보	국내 양돈 약 500농가 대상 대장균, 살모넬라 등 약 760여 균주의 미생물학적 특성 조사 및 주요 병원성 원인체의 항생제 감수성 및 내성인자 특성조사를 완료하고, 분리주에 대한 유전자원 확보를 완료하였음.
② 주요 병원성 원인체의 항원 및 병원성 유전자 검색을 통한 분자생물학적 특성 조사	국내 양돈농가 유래 병원성 대장균의 부착인자, 독소산생 유전자 분석 및 유전학적 상동성 비교분석을 통하여 국내 우세 병원성 균주는 높은 유전학적 근연관계를 보이는 분자생물학적 특성을 확인함.
③ 분자생물학적 기법을 이용한 소화기계 감염병 원인균 신속진단검출기법 개발	세균성 돼지 소화기계 감염병 진단을 위한 특이적 primer를 제작하여, Multiplex PCR법을 이용한 신속진단검출기법을 개발하였으며, 국내 분리주를 이용한 교차반응 검사를 통하여 유용성을 확인함.
④ 돼지 세균성 소화기계 감염병 신속진단 키트 개발	신속진단 기법 개발 및 이를 활용한 돼지 소화기계 감염병 5종 원인체 (pathogenic <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> 및 <i>Lawsonia intracellularis</i>)를 신속진단 검출하는 키트를 개발하였으며, 현장진단 적용시험을 통해, 신속진단 키트가 현장에서 즉시 적용이 가능함을 확인하였음.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	동물감염병 분야	
연구과제명	돼지 생식기계 감염병 관리 및 ICT 융합 동물감염병 관리시스템 개발			
주관연구개발기관	충북대학교 산학협력단		주관연구책임자	현상환
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	8,000,000	2,644,000		10,644,000
연구개발기간	2020.01.31.~2024.01.30			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 설계	- 목표 시스템은 소프트웨어 개발 방법론을 선정하고 개발 방법론에 의거하여 요구사항 분석, 사용자 인터페이스(사용자 화면) 설계, 데이터베이스 설계를 진행하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 구축	-농가별 생육환경, 축산시설 출입 차량의 GPS 좌표 등의 실시간 수집을 위한 IoT센서 데이터 활용기반 기능 개발하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 고도화	- ICT 돈사관리 시스템v1.1을 이용하여 데이터 수집 및 보관 뿐만 아니라, 농가전체의 온도나 습도 등을 모니터링하는 IoT 센서 데이터를 추가 개발하여 기후, 발병 등의 문제 발생을 최소화하고, 전반적 돈사 관리의 편리성을 증대하였음
·돼지 번식관리 및 ICT융합 동물감염병 관리 시스템 안정화	-돈사 관리 프로그램을 통하여 다수의 축사 내에 시스템을 납품하여, 발병 가능성 분석 및 확산 예측모델 데이터화를 진행하였음 -향후 프로그램 커스터마이징을 통하여 축사 이외에 적용할 수 있는 관리 프로그램 구축 예정임

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	국가재난형 진드기 매개질병 감염 방제를 위한 진드기 백신 항원 개발			
주관연구개발기관	전북대학교 산학협력단		주관연구책임자	유명조
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	600,000	0	0	600,000
연구개발기간	2020. 01. 31 - 2024. 01. 30 (48개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① <i>H. longicornis</i> 의 동정 및 유전학적 방법을 활용한 cDNA library 의 구축 및 degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색	· <i>H. longicornis</i> 의 배양 ·실험실 내 진드기의 각 단계별 사육법을 구축 · <i>H. longicornis</i> 유전자 full length cDNA library 의 구축 ·degenerate PCR을 활용한 유용 유전자의 탐색
② 각 단계별 진드기 약충, 성충의 흡혈 전후에 따른 진드기 단백질 성상의 평가 및 유용 유전자의 탐색	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기유전자분석 ·면역스크린법에 의한 진드기 유전자 탐색 ·진드기 유래 생리활성유전자의 동정
③ 재조합 유전자의 전염병에 대한 면역 정상검사	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기유전자분석 ·생리활성 유전자의 발현 및 정제시스템 구축 ·단백질 발현에 따른 영향분석
④ 생리활성단백질의 재조합 항원 단백질을 통한 면역증강의 효과 검증	·진드기 배양 시스템의 유지 및 진드기유전자분석 ·재조합 항원을 통한 면역증강 및 백신 기술 확보

3. 연구목표 대비 성과

○ 총괄

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용·홍 보		기타 (타연 구활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	석 사 (일 반)		석 사 (특 수)	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시		
													S C I	비 S C I								논 문 평 균 I F	
단위	건	건	건	평 인 제 업	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	5	10	10		10	10	5	5	5	5					20	10	5						
최종 목표	17	13	6		7	60	7	400	50	9			40	24	0	6	3	15	14	25	29	0	
실적	15	2	6		11	90.3	6	161.98	51	26			79	14	23.696	65	4	50	32	27	34	22	
달성률 (%)	88	15	100		157	150	85	40	102	289			197	58		108.3	133	333	228	108	126		

○ 총괄(충북대)

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용·홍 보		기타 (타연 구활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	일 반		특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시		
													S C I	비 S C I								논 문 평 균 I F	
단위	건	건	건	평 인 제 업	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	5	10	10		10	10	5	5	5	5					20	10	5						
최종 목표	9	6	6		4	30	4	400	50	9			17	15	6	8	6	12	20	0			
실적	9	2	6		9	65.3	6	161.98	51	25			45	8	38	17	8	10	23	9			
달성률 (%)	100	33	100		225	217	150	40	102	278			265	53	633	212	133	83	128				

○ 1-1세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용액) (이)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10	10		10	10				5						35	10			
최종 목표	3	2	6		2	20				4			7	5		10	7			
당해 년도	목표	1	1	2		1	10			1			2	2		6	2			
	실적			2		2	16. 25			5			6			6	2			
달성률 (%)	0	0	100		200	160				500			300	0		100	100			

○ 1-2세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용액) (이)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	5			10	15	5		5	5						30	5			
최종 목표	2	2	0	0	1	10	3	0	50	4	0	0	4	4	0	0	0	0	4	0
당해 년도	목표	0	1	0		1	5	1	50	1			1	1		6	1			
	실적	2				1	23	1	51	4			2		7	6	3	4		
달성률 (%)		0			100	100	100		100	100			100	0		100	100			

○ 1-1협동

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등)	
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	명	건	건		
가중치	10	10					30	30		10								10		
최종 목표	2	1					1	400		1		2	2					3		
당해 년도	목표	1	1				1	400		1			1					1		
	실적	1	1				1	161.98		1				2				2		
달성률 (%)	100	100					300	40.5		100			0					200		

○ 1-2협동

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표												
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등)				
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	일 반		특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시
													S C I	비 S C I									
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	명	명	명	명	명			
가중치	20	20													20	20		20					
최종 목표	2	1										4	4	6	4	2		6					
실적	1	0										3	2	5	4	5		0					
달성률 (%)	50	0										75	50	83	100	250		0					

○ 총괄(전북대)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	일 반		특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시		
													S C I	비 S C I								논 문 평 균 I F	
단위	건	건	건	평 균 등 급	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	10	10			10	10	15									20	15		10				
최종 목표	3	3			1	20	3						12	6		3	4	6	10	6			
실적	1	0			1	20	0						20	5		4	18	10	11	8	10		
달성률 (%)	33	0			100	100	0						166	83		133	450	166	110	133			

(단위 : 건수, 백만원, 명)

○ 2-1세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	일 반		특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시		
													S C I	비 S C I								논 문 평 균 I F	
단위	건	건	건	평 균 등 급	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	20	15					15									20	15		15				
최종 목표	1	1					1						4	2		2	2	4	2				
실적	0	0					0						12	0		8	9	4	7	3	5		
달성률 (%)	0	0					0						300	0			450	200	175	150			

○ 2-2세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표										
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성			정책 활용·홍 보		기타 (타연 구활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	비 S C I	논 문 평 균 I F		학 술 발 표	일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	
												S C I				S C I						학 술 발 표
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건		
가중치	15	15			10	10	15									15	10		10			
최종 목표	1	1			1	20	1					4	2			1	2	3		2		
실적	1	0			1	20	0					2	4	10		4	3	1		3	5	
달성률 (%)	100	0			100	100	0					50	200			400	150	33		150		

○ 2-3세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표										
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성			정책 활용·홍 보		기타 (타연 구활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	비 S C I	논 문 평 균 I F		학 술 발 표	일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	
												S C I				S C I						학 술 발 표
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건		
가중치	20	15					15								15	20			15			
최종 목표	1	1					1					4	2		3	1	2	3		2		
실적	0	0					0					6	1	4	3	5	3	3		2		
달성률 (%)	0	0					0					150	50		100	500	150	100		100		

○ 총괄(건국대)

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 I F		학 술 발 표	일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I									
단위	건	건	건	평 관 제 이 니 기	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	10	10			10	10										25	25		10				
최종 목표	5	4			2	10							11	3		3	2	3	3				
실적	5	0			1	5				1			14	1	13. 44 9	5			3	3			
달성률 (%)	100	0			50	50							127	33					500	70 0	533	100	

○ 3-1세부

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 I F		학 술 발 표	일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I									
단위	건	건	건	평 관 제 이 니 기	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	30	30			20	20																	
최종 목표	2	2			1	10							4										
실적	2	0			1	5							4		1				4	5	2	1	
달성률 (%)	100	0			100	50							100										

(단위 : 건수, 백만원, 명)

○ 3-2세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	논 문 평 균 I F	학 술 발 표	기 타		일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	평 균 점 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	10	10			10											35	35						
최종 목표	2	1			1							4				3	2	3					
실적	2	0			0				1			5		13. 449	1	6	5	3			1		
달성률 (%)	100	0			0							125				200	25 0	100					

○ 3-3세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표											
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성			정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	논 문 평 균 I F	학 술 발 표	기 타		일 반	특 수	취 업 인 력	정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	평 균 점 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	명	명	건	건			
가중치	40	40																		20			
최종 목표	1	1										3	3							3			
실적	1	0										5	1			5	4	1		3	1		
달성률 (%)	100	0										166	33							100			

4. 핵심기술

○ 1-1세부

구분	핵심기술명
①	돼지 세균성 소화기계 감염병 5 종의 진단을 위한 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도

○ 2세부

구분	핵심기술명
①	에놀라아제 단백질을 유효성분으로 포함하는 진드기 감염 예방용 백신 조성물 및 이의 용도

5. 연구결과별 기술적 수준

○ 1-1세부

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

○ 2세부

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v			v	v		v		
②의 기술										
③의 기술										
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

○ 1-1세부

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	돼지 세균성 소화기계 감염병 5종의 신속 진단을 통한 관련 감염병의 예방 효과

○ 2세부

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	진드기감염 예방용 백신의 현장 적용시험을 통한 관련 감염병의 방제 효과
②의 기술	
③의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

○ 1-1세부

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구활용영역) (이)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 균 건 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	80																		
최종목표	3	2																		
연구기간내 달성실적	2	0																		
연구종료후 성과장출 계획	1	2																		

○ 2세부

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구활용영역) (이)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 균 건 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치		100																		
최종목표		1																		
연구기간내 달성실적		0																		
연구종료후 성과장출 계획		1																		

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

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 3. 18.

기관명 : 충북대학교

점검자 : 이완규

(서명) 이완규

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출


구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	√	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	√	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	√	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	√	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	√	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	√	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	√	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	√	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	√	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	√	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	√	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	√	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	√	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024.03.05

기관명 : 충북대학교

점검자 : 현 상 환



농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 3. 7.

기관명 : (주)중앙백신연구소

점검자 : 강신영 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

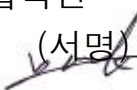
구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	0	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	0	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	0	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	0	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	0	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	0	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	0	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	0	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	0	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	0	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	0	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	0	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	0	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	0	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	0	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	0	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 3 . 1 .

기관명 : 서울대학교 산학협력단

점검자 : 김 단일

(서명)


농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 3. 8.

기관명 : 전북대학교

점검자 : 유명조

(서명)



농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오	
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	V		
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	V		
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V		
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	V		
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V		
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	V		
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	V		
	부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	V	
		12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	V	
13		저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	V		
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	V		
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	V		
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V		

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 03 . 19 .

기관명 : 건국대학교 산학협력단

점검자 : 류영수 (서  명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	V	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	V	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	V	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	V	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	V	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	V	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	V	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	V	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	V	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	V	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 03 . 20 .

기관명 : 건국대학교 산학협력단

점검자 : 이 상 원 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	V	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	V	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	V	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	V	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	V	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	V	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	V	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	V	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	V	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	V	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	V	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	V	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 03 . 19 .

기관명 : 건국대학교 산학협력단

점검자 : 최 인 수

농림식품기술기획평가원장 귀하

주 의

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