

122016-
2

국제
신변종
바이러스
유전체
분석
센터
구축

최
종
보
고
서

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004648-01

국제 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 구축

2024. 06. 18.

주관연구기관 / 경북대학교 산학협력단
공동연구기관 / 건국대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국제 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 구축”(개발기간 : 2022. 04. 01 ~ 2023. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.18.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 공 성 호 (인)

공동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 윤 동 열 (인)

주관연구책임자 : 권 정 훈

공동연구책임자 : 남 상 섭

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

최종보고서										보안등급	
										일반[], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			가축질병대응기술개발사업	
전문기관명 (해당 시 작성)					사업명		내역사업명 (해당 시 작성)				
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		122016-2				
기술분류	국가과학기술 표준분류	수의 전염병 LB0701		50 %	수의 미생물/기생생물 LB0704		30 %	동물 질병예방 LB0710		20 %	
	농림식품과학기술분 류	수의 미생물/기생생물 RB0104		50 %	동물질병관리 RB0201		30 %	인수공통감염병관리 RB0202		20 %	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		국제 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 구축							
		영문		International viral genome analysis center for emerging diseases							
주관연구개발기관		기관명		경북대학교 산학협력단			사업자등록번호		504-82-09678		
		주소		(우 41566) 대구광역시 북구 대학로 80			법인등록번호		176271- 0001921		
연구책임자		성명		권정훈			직위		조교수		
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()				합계		연구개발비 외 지원금
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계
총계		968,000							968,000		968,000
1단계		1년차	416,000						416,000		416,000
		n년차	552,000						552,000		552,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		건국대학교		남상섭		교수				비고 역할 기관유형	
위탁연구개발기관										공동 대학	
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명		권정훈			직위		조교수		
		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 02 월 28 일

연구책임자: 권 정 훈 (인)

주관연구개발기관의 장: 경북대학교 산학협력단장 공 성 호 (직인)

공동연구개발기관의 장: 건국대학교 산학협력단장 윤 동 열 (직인)

농림축산식품부장관 · 농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호	122016-2
기술 분 류	국가과학기술 표준분류	수의 전염병 LB0701	50 %	수의 미생물/기생생물 LB0704	30 %	동물 질병예방 LB0710	20%
	농림식품 과학기술분류	수의 미생물/기생생물 RB0104	50 %	동물질병관리 RB0201	30 %	인수공통감염병관리 RB0202	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		국제 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 구축					
전체 연구개발기간		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)					
총 연구개발비		총 968,000 천원 (정부지원연구개발비: 968,000 천원, 기관부담연구개발비 : 0천원, 지방자치단체: 0천원, 그 외 지원금: 0천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ AI, ASF 등 국제 신종 병원체 유전체 분석 센터 건립 및 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축 - NGS 활용 염기서열 분석 기술 개발 및 표준화 - 유전체 빅데이터 기반 정밀 분자 역학 연구 - 바이러스 유전체 분석 센터 운영 및 사업화 ○ 국제 유전체 빅데이터 기반 백신 및 진단기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 빅데이터 기반 진단법 개발 및 산업화 - 유전체 빅데이터 기반 내수 및 수출용 백신 균주 개발 및 산업화 			
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ 신·변종 바이러스 유전체 분석 센터 건립 및 사업화 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 유전체 빅데이터 생성을 위한 유전체 분석 센터 설립 및 분석 서비스 제공을 통한 사업화 진행 - 기존 유전체 분석 서비스와 차별화된 바이러스 유전체 분석 전문 서비스 제공 및 phylogenetic 분석 등 추가 분석 제공 - 국가 긴급 재난형 질병 발생 시 방역당국과 협조할 수 있는 긴급 분석 서비스 진행 ○ 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 미국 코네티컷 대학 / 몽골 생명과학 대학 / 브라질 상파울로 대학을 중심으로, 이란, 인도, 인도네시아, 러시아, 캄보디아, 잠비아 등으로 확장되는 연구 네트워크를 구성 - 발생 상황 및 유전체 빅데이터 공유 - 각국의 질병 발생 시료 확보 및 유전체 분석 서비스 제공 - 개발도상국 NGS 분석 기술 지원 ○ NGS 활용 신·변종 병원체 분석 기술 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 시료 별 전처리 기술 표준화 - ASF 등 대형 바이러스 NGS 분석 기법 확립 - NGS 결과 분석 workflow 확립 ○ 국제 AI 바이러스 시료 확보 및 전장 유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 몽골, 러시아 등 야생조류 여름철 번식지에서의 시료 채취 및 유전체 분석 및 전파 경로 분석 			

		<ul style="list-style-type: none"> - 미국 알래스카 지역에서의 바이러스 유전정보 분석 및 대륙간 바이러스 이동 정보 분석 ○ 국제 ASF 바이러스 시료 확보 및 전장 유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 미국 코네티컷 대학의 기존 네트워크를 활용하여 ASF 원발지인 아프리카 지역 (잠비아) 및 중국 주변국 (인도, 캄보디아, 몽골)과 바이러스 유전체 공동 분석 연구 수행 - ASF 유전체 분석을 통한 바이러스 전파경로 분석 및 향후 발생 예측 기반 제공 ○ 유전체 빅데이터 기반 분자 진단기술 및 백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 확보된 유전체 빅데이터를 기반으로 현재 유행주 및 향후 발생 바이러스에 적용 가능한 진단기술 개발 및 특허 출원 - 확보된 국내외 바이러스를 활용하여 항원성을 분석하고, 이를 통해 내수 및 수출 범용 광범위 방어 가능 백신 후보주 개발 및 특허 출원
--	--	--

연구개발성과	<p><정성적 연구결과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 사업화를 위한 바이러스 NGS 분석 센터 (사명: 바이로진) 창업 완료 ○ AI, ASF 등 바이러스 대상 NGS 분석 프로토콜 구축 ○ 몽골 아프리카돼지열병, 조류인플루엔자 등 바이러스 시료 82건 확보 및 분석 ○ 베트남 조류인플루엔자 시료 80건 확보 및 분석 ○ 브라질 뉴캐슬병, 조류인플루엔자, 전염성기관지염 바이러스 전장 유전체 30건 이상 확보 및 분석 ○ 인도네시아 닭 전염성기관지염 바이러스 6건 확보 및 분석 ○ 캄보디아 아프리카돼지열병 바이러스 유전자 30건 이상 확보 및 시퀀싱 진행 ○ 인도 PRRSV 5건 확보 및 분석 ○ 잠비아 아프리카돼지열병 바이러스 49건 유전체 확보 및 분석 ○ 이란 가금 및 야생조류 바이러스 시료 92건 확보 ○ 국내 발생 AI, ASF 전장 유전체 분석 및 연학 연구 ○ H5형 조류 인플루엔자 검출용 real-time PCR 시스템 구축 ○ HPAI 등 민간 병원체 자원 은행 구축 ○ 뉴캐슬병 기반 바이러스 벡터 개발 ○ 뉴클레오사이드 이용 바이러스 약독화 기법 개발 <p><정량적 연구결과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 특허출원 2건: 100% 달성 ○ 기술이전 1건: 100% 달성 ○ 기술료 300만원: 초과 달성 ○ 매출액 17.325 백만원: 173% 초과달성 ○ 논문 4건: 133% 초과달성 ○ 논문 평균 IF 6.15: 140% 초과달성 ○ 학술발표 4건: 133% 초과달성 ○ 교육지도 5건: 125% 초과달성 ○ 타연구과제 활용 4건: 200% 초과달성
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 지속 운영 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제를 통해 설립된 유전체 분석 센터 및 확립된 protocol은 향후 지속적인 국내외 바이러스 유전체 빅데이터 생산에 기여할 예정임. - 유전체 분석센터의 분석 서비스를 통해 지속적인 경제 가치 창출이 가능할 것으로 기대됨. ○ 신변종 바이러스 분자 역학 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구과제를 통해 확보된 유전체 빅데이터 및 분석기술은 향후 발생하는 다양한 질병 역학 연구에 활용될 것으로 기대됨. ○ 학술 성과 도출 <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 바이러스 분자역학 연구결과는 SCI 논문 발표를 통해 국내외 연구자들에게 질병 제어에 필요한 정보를 제공하고, 다수의 학술 성과를 지속적으로 도출할 것으로 기대됨. ○ 타연구 및 정책 활용 <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 빅데이터 구축은 현재 급속도로 발전 중인 데이터 분석 과학과 접목되어 질병 발생 예측 등 다양한 연구 분야에 활용될 것으로 기대됨.
---------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> - 유전체 기반 분자역학 연구 결과는 향후 국가 질병 제어 정책 수립에 핵심적인 기반 지식을 제공해줄 것으로 기대됨. ○ 백신 개발 및 사업화 - 본 연구를 통해 개발된 뉴캐슬병 벡터 및 약독화 기술은 다양한 바이러스에 적용할 수 있는 기술로 다양한 백신 개발 및 사업화에 활용될 수 있을 것으로 기대됨. 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	- 해당없음.											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	4	2						생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	바이러스 유전체		유전체 빅데이터		차세대 염기서열 분석		조류 인플루엔자		아프리카 돼지열병			
영문핵심어 (5개 이내)	Viral genome		Bigdata in genomics		Next-generation sequencing		Avian influenza		African swine fever			

< 목 차 >

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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발과제의 최종 목표

○ AI, ASF 등 국제 신종 병원체 유전체 분석 센터 건립 및 사업화

- 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축
- NGS 활용 염기서열 분석 기술 개발 및 표준화
- 유전체 빅데이터 기반 정밀 분자 역학 연구
- 바이러스 유전체 분석 센터 운영 및 사업화

○ 국제 유전체 빅데이터 기반 백신 및 진단기술 개발

- 유전체 빅데이터 기반 clade 2.3.4.4 조류 인플루엔자 진단법 특허 출원
- 유전체 빅데이터 기반 clade 2.3.4.4 조류 인플루엔자 백신후보주 선정 및 특허 출원

2) 연구개발과제의 내용

○ 신·변종 바이러스 유전체 분석 센터 건립 및 사업화

- 경북대학교-건국대학교 공동 연구소 또는 자회사 설립을 통한 바이러스 유전체 분석 시스템 사업화
- 기존 NGS 서비스와는 다른 긴급 대응 및 전문 결과 분석 시스템을 통해 정부 및 개인 연구자들과 협력 가능한 유전자 분석 서비스 시스템 구축
- 바이러스 시료 또는 DNA 시료를 의뢰받아 전처리 후 NGS 분석 진행
- 분석기술 표준화 및 전문 인력 운영을 통한 3일 내 NGS 결과 전송 가능 긴급 분석 서비스 구축 (소량 시료 대상)
- 유전체 분석 결과의 phylogenetic, phylogeography, phylodynamic 등 전문 분석 서비스 제공
- 설립된 분석 센터는 정부기관 및 개인연구자를 대상으로 사업을 실시할 예정이며, 분석 시료당 약 50만원 + 조립 및 phylogenetic 분석에 대한 추가 분석료를 통해 사업화 성과를 달성하고자 함.

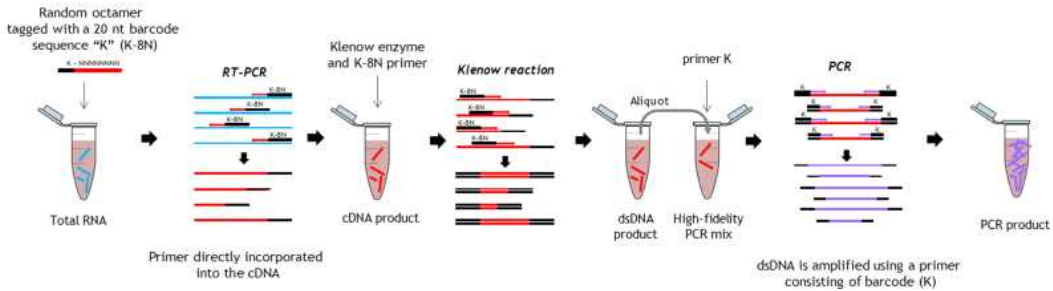
○ 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축

- 국제 공동연구 네트워크 구축: 미국 코네티컷 대학의 이동훈 교수, Guillermo Risatti 교수 / 몽골 생명과학 대학의 Erdene Ochir Tseren Ochir 교수 / 브라질 상파울로 대학의 Helena Lage Ferreira 교수를 중심으로, 이란, 인도, 인도네시아, 러시아, 캄보디아, 잠비아 등으로 확장되는 연구네트워크를 구성 하고자 함. (연구 추진체계 참고)
- 발생 상황 및 유전체 빅데이터 공유: 네트워크 참여 각 국가로부터 AI, ASF 또는 주요 신·변종 병원체에 대한 발생상황 및 시료 또는 유전체 정보를 확보하고자 함. 해외로부터 바이러스 시료, DNA 시료 또는 유전체 염기서열 정보 수령 예정. 고위험 바이러스의 경우 건국대학교의 생물안전3등급 실험실을 활용가능함.
- 국제 공동 연구 세미나 개최: 본 AI-ASF 연구 네트워크 구축 포함되는 미국, 브라질, 몽골, 방글라데시, 대만, 캄보디아, 아프리카 잠비아, 인도, 인도네시아, 이란 등 각국의 해당 연구자들이 연 1회 이상 모여 해당 기술 및 정보를 공유할 수 있는 학회 및 워크숍을 개최할 예정임.
- NGS 분석 기술 지원: 몽골, 방글라데시, 캄보디아, 아프리카 등 NGS 분석 시스템이 완비되지 않은 국가에 NGS 분석 기술을 교육하고 전수하여 전 세계적인 유전체 빅데이터 확보에 기여할 예정임.
- 유전체 정보 및 Metadata 공유 시스템 구축: 네트워크 참여연구자 간 염기서열 및 Metadata를 손쉽게 공유할 수 있는 시스템을 구축하여 국제 공동연구를 통한 유전체 빅데이터 생성을 가속화 하고자 함. 염기서열 뿐 아니라 관련 Metadata(축종, 분리일자, 분리지역, 증상 등)를 공유하고 GISAID 등에 함께 공개 하고자 함.

○ NGS 활용 신·변종 병원체 분석 기술 표준화

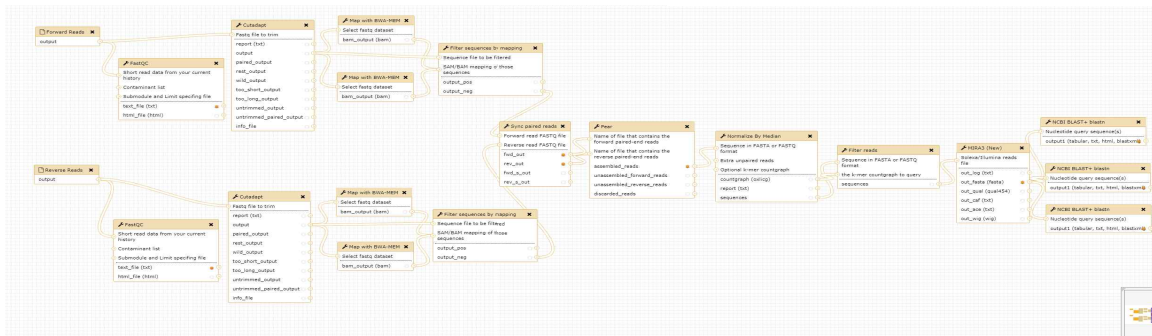
- 전처리 기술 표준화: NGS 분석을 위한 AI 및 ASF 유전체 추출 및 DNase, RNase 처리 방법 최적화 및 표준화. Random-primer 기반 유전체 증폭 방법 최적화 및 기존 방법 개선
- ASF 등 대형 바이러스 NGS 분석기술 표준화: ASF 등 유전체가 크고 반복서열이 많은 경우 150bp 정도로 분석 길이가 짧은 illumina사 장비 이용 분석이 제한적임. 이에 따라 MinION 등 3세대 NGS 분석 장비와 illumina사 장비의 조합을 통해 분석이 필요함. 이에 대한 자세한 프로토콜을 정립하고 표준화 하고자 함.

Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA)



<그림. NGS 분석을 위한 single random primer 기반 RNA 유전체 증폭방법: SISPA (연구팀 사전 연구결과 - Chrzastek and Lee et al., Virology, 2017)>

- NGS 결과 조립 workflow 및 서버 구축: NGS 결과의 filtering, normalization 및 조립에 대한 세부 조건을 최적화하고 하나의 workflow를 구성하여 쉽게 NGS 분석결과를 해독할 수 있는 시스템을 정립하고자 함. 해당 workflow를 각 바이러스 및 용도에 맞게 최적화할 예정임. 해당 workflow를 이용할 수 있는 오픈 서버를 구축하고 공개하여 관련 부처 및 개발도상국 연구자들이 쉽게 활용 가능하도록 할 예정임.



<그림. Galaxy platform 활용 NGS 결과 조립 workflow 예시>

○ 국제 AI 바이러스 시료 확보 및 전장 유전체 분석

- 기존 국제 네트워크 활용: 건국대학교 연구진은 몽골, 러시아를 포함한 인접국과의 국제 협력을 통해 국내 유입 가능성이 있는 바이러스에 대한 협동예찰 및 시료 수입, 병원체를 확보해왔음. 본 연구에서는 최적화된 바이러스 유전체 분석 프로토콜을 개발하고 협력국들에 적용하여 신속하고 정확한 바이러스 유전정보 확보 및 정보 공유를 하고자 함.

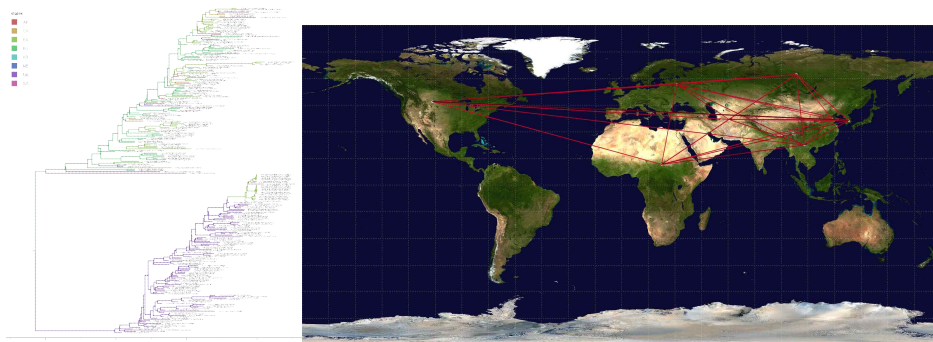


<그림. 몽골 협동예찰 수행 사진>



<그림. 러시아 협동예찰 수행 사진>

- **신규 국제협력체계 구축:** 본 연구과제를 통해 신규 국제협력체계를 구축하고자 함. 중국유래 고병원성 조류인플루엔자 상재국인 인도네시아의 유행 중인 바이러스 정보확보를 위해 인도네시아 축산기업인 JAFPA Comfeed와 협력할 예정임. 또한, 바이러스의 유라시아-아메리카 대륙 간 철새 이동을 통한 바이러스의 전파가 다수 보고됨에 따라 아메리카대륙의 바이러스 유전체 정보를 확보하고 바이러스의 전파 패턴분석을 위해 미국 알래스카 USGS 지질조사국의 Andrew Ramey 박사 연구팀과 공동연구 협력관계를 구축할 예정임.



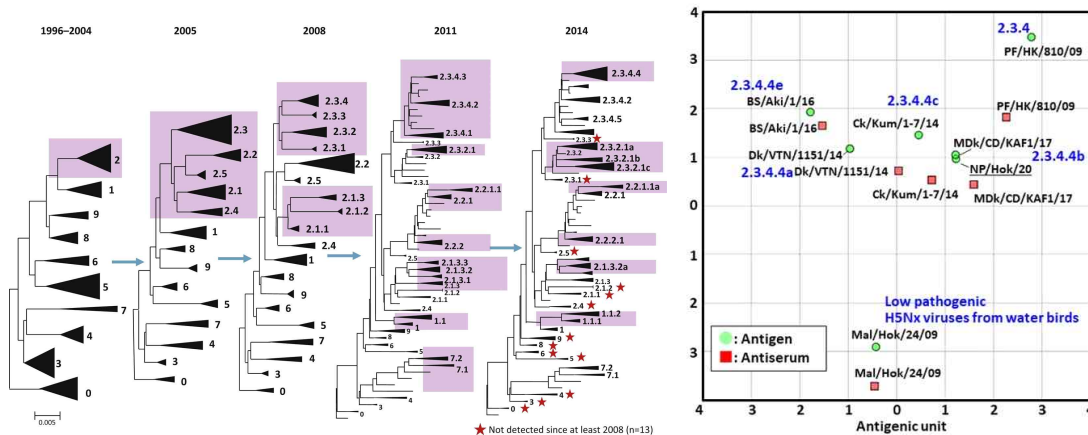
<그림. H10 아형 A 바이러스의 phylogeography 유전자 분석기법을 통한 대륙간 이동 분석 (출처: 지원자 사전 연구 결과 - 건국대학교 연구팀)>

- **고위험 바이러스 NGS 분석:** 국외에서 시료를 수입할 경우, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스, 아프리카 돼지열병 바이러스 등 고위험체 시료는 수입절차가 까다로우며, 고위험체 전용 검사 시설인 생물안전3등급 실험실(Biosafety level 3, BL3)이 필수적임. 건국대는 BL3시설을 보유하고 있으며, 이를 통해 고위험 바이러스에 대한 시료 처리 및 NGS 분석 가능.



<그림. 건국대 보유 BL3 동물실험 시설 사진>

- 국내유입 HPAI간 교차면역원성 평가: 고병원성 조류인플루엔자의 경우, 다양한 clade·subclade로 분화돼 현재 전세계적으로 clade 2.3.4.4b H5Nx형 바이러스가 발생 중임. 국내 발생사례가 있는 바이러스의 경우, 유전체 검사, 동물실험 등 다양한 검사가 진행되고 있으나, 다양한 clade의 바이러스 간의 항원성 연구는 부족한 실정임. 년도별, clade별 HPAI를 대상으로 항원지도를 제작하여 항원성에 대한 기초지표를 세우고, 신규한 백신 후보주에 대한 *in vitro* 평가를 통한 적합성 검사법 확립할 예정임.



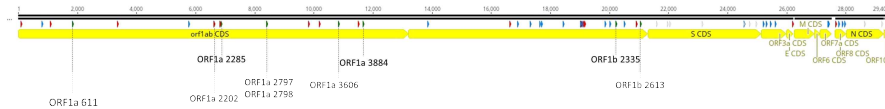
<그림.HA 유전자를 이용한 HPAI H5N1 바이러스의 clade 분화(왼쪽)와 2020년 일본 분리 H5N8 clade 2.3.4.4b HPAI 바이러스의 antigenic cartography(오른쪽)>

○ 국제 ASF 바이러스 시료 확보 및 전장 유전체 분석

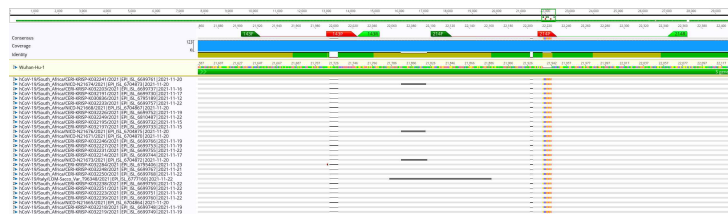
- 미국 코네티컷대학교 (University of Connecticut) 의 연구진은 아프리카돼지열병의 원 발생지인 아프리카 잠비아 및 중국 주변국들 (인도, 캄보디아, 몽골) 과 바이러스 진단 기술지원 공동연구를 진행하고 있음.
- 코네티컷대학교는 선진국 수준의 바이러스 유전자 분석 기술지원이 가능한 건국대학교/경북대학교를 아시아 거점 연구 파트너로 국제협력 네트워크를 구성하고자 함.
- 잠비아, 인도, 캄보디아, 몽골 등 국가들에 대하여 생물안전교육, 바이러스 시료 확보기법, 유전자 추출 및 진단기법에 대해 기술지원, 인적교류, 현장교육을 실시하여 대상국들 및 주변지역으로부터 지속적으로 시료확보가 가능한 네트워크를 구성 및 확장하고자 함.
- 분자진단 기법으로 검출된 바이러스들의 전장 유전체를 분석하고 발생 정보를 공유 받아 국내 유입 가능한 감염병을 예측하고 선제대응을 할 수 있는 체계를 확보함.
- 코네티컷대학교는 질병진단 및 유전체 빅데이터 분석을 전문적으로 하는 4개의 부설연구소들을 기반으로 본 과제에 필요한 바이러스 진단, 유전자 빅데이터 분석, 백신/면역연구에 대한 현장 교육을 실시하고자 함.

○ 유전체 빅데이터 기반 분자 진단기술 개발

- 유전체 빅데이터 분석 및 변이 분석을 통하여 변이가 가장 적은 부분을 탐색하고 이를 기반으로 새로운 primer 및 probe를 제작하여 분석 효율을 향상시키고자 함.
- 다양한 primer 및 probe 후보군에서 현재 유행주를 검출할 수 있는 최적의 진단 기술을 확보하고 이에 대한 특허를 출원하고자 함.
- 현재 유행주 유전체를 기반으로 H5형 또는 H7형 감별 가능한 real-time PCR 시스템의 민감도를 10배 이상 향상 시키는 새로운 primer 및 probe 제작
- 고병원성 조류 인플루엔자의 경우 현재 유행 중인 주요 clade(2.3.4.4b 및 2.3.4.4c)를 구분할 수 있는 감별 진단용 primer 및 probe를 개발하고 이에 대한 특허 출원



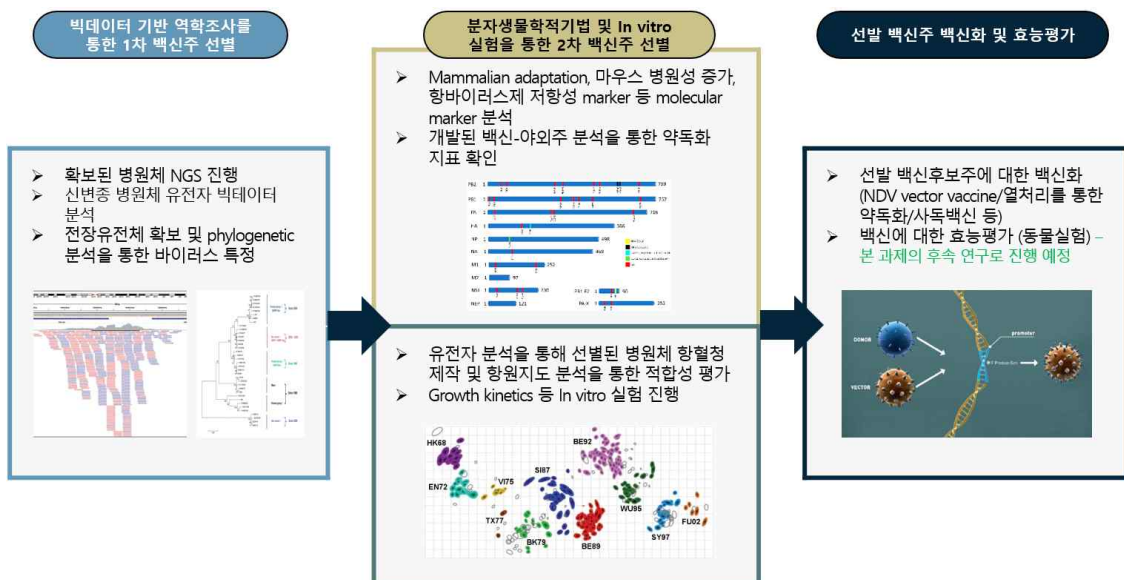
<그림. 코로나19 주요 가변부위 탐색 결과 (지원자 사전연구 결과)>



<그림. 유전체 빅데이터 기반 오미크론 감별 진단 primer 및 probe 제작>
(지원자 사전연구 결과)

○ 유전체 빅데이터 기반 백신 선발

- 유전체와 병원성의 변이가 다발하는 RNA 바이러스의 경우, 백신 개발이 어려우며, 생백신을 사용하는데 한계가 있음. 따라서 현장 상황에 맞는 최신 백신주 선발이 필요하며, 선발을 위한 유전적, 실험적 데이터가 충분해야 백신의 효과가 극대화 됨.
- 백신 후보주 선발: 병원체뱅크를 통해 수집된 다량의 바이러스에 대한 1차 선발(전장유전체 분석 및 phylogenetic analysis)을 진행할 예정. 1차선발 후 분자생물학적 기법 및 In vitro 실험을 통한 2차 백신주 선발을 진행, 최종 선발 균주의 백신화 및 효능평가로 백신주 개발하는 것이 최종 목표임.



< 그림. 유전체 빅데이터 기반 백신 선발 전략 도식 >

- 건국대학교 연구진은 전염성 기관지염 코로나바이러스(Infectious Bronchitis Virus: IBV)를 이용한 약독화 연구를 수행해 왔으며, 약독화 과정을 통해 변이된 약독화주와 야외주의 유전체를 비교해 바이러스의 병원성에 영향을 미칠 수 있는 지표에 대한 연구를 지속하고 있음.
- 최신 역학조사 기반 대표 고병원성 조류인플루엔자 백신주 선발 및 백신화 : 현재 고병원성 조류인플루엔자 백신이 시행되지 않으나 국가사업을 통해 긴급백신용 항원뱅크가 구축돼 있음. 2020~22년 유행한 고병원성 조류인플루엔자의 경우, 역학조사가 완료되지 않은 상황임. 따라서, 최신 유행 고병원성 조류인플루엔자에 대한 백신주평가를 진행 예정.

3) 세부과제별 연차별 수행 내용

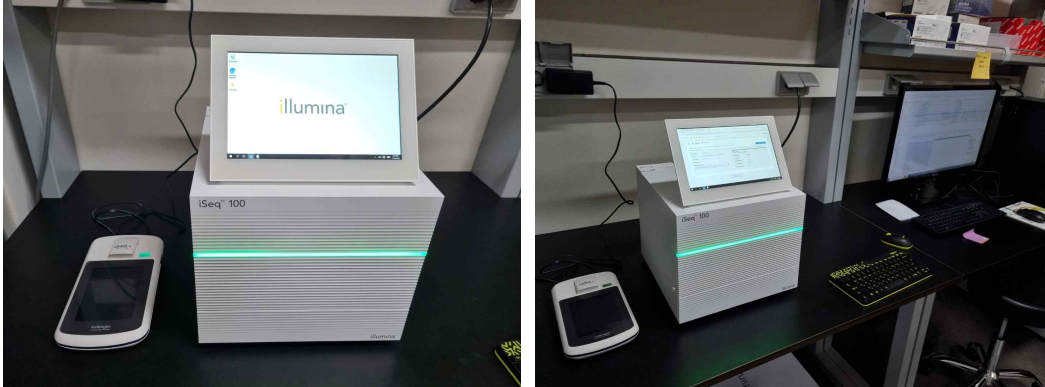
	<주관연구기관> 경북대학교	<공동연구기관> 건국대학교	<국제공동연구기관> University of Connecticut Mongolian University of Life Sciences Universidade de São Paulo
1 차 년 도	국제 공동 연구 네트워크 및 기술공유 체계 구축 - 국제 세미나 개최 - 기술지원	국제 HPAI 시료 및 유전체 확보 - 신규: 알래스카, 인도네시아, 이란 등 - 기존: 몽골, 러시아 등	University of Connecticut - 국제 ASF 시료 및 유전체 확보 - ASF 유전체 분석 및 NGS 분석 센터 활용 자문
	신·변종 병원체 NGS 분석 센터 구축 - 민간, 긴급대응, 결과 분석 - 인플루엔자, 코로나 바이러스 등 각 병원체 별 NGS 분석기술 표준화	고위험 병원체 NGS 분석 센터 구축 - 민간, 긴급대응, 결과 분석 - HPAI, ASF 분석기술 표준화	Mongolian University of Life Sciences - 몽골 AI/ASF 포함 동물 병원체 확보
2 차 년 도	신·변종 병원체 유전자 빅데이터 구축 및 분석 - Phylogeography - Phylodynamic	HPAI등 민간 병원체 자원 은행 구축 - 국내·외 병원체 간 교차 방어능 평가 - 국내 진단기술 평가	Universidade de São Paulo - 브라질 발생 동물 질병 바이러스 및 유전체 확보 - 확보된 병원체의 진단 및 NGS 분석을 위한 시료 송부
	유전체 빅데이터 기반 분자 진단 기술 개발 - 조류 인플루엔자 진단용 real-time PCR 시스템 업데이트 - H5형 HPAI 바이러스 검출용 real-time PCR 시스템 개발	유전체 빅데이터 기반 조류 바이러스 백신주 개발 - HPAI 백신 후보주 선별 - IBV 내수용 및 수출용 백신 개발	- 질병발생 정보 및 분리된 병원체의 Metadata 공유

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 신·변종 바이러스 유전체 분석 센터 건립 및 사업화

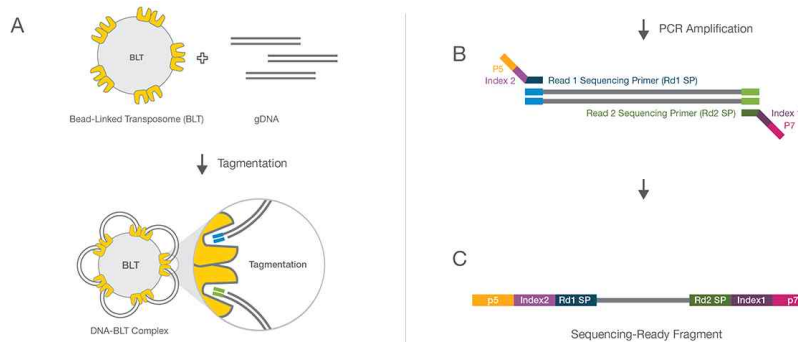
○ 기본 장비 구축 및 교육

- illumina사의 iseq 100 system, Thermo Fisher Scientific사의 Qubit4 fluorometer 및 분석용 work station을 기반으로 한 NGS 분석 기본 시스템 구축



<그림. NGS 분석을 위한 기본 장비 구축>

- illumina사의 신규 library prep kit의 경우 library DNA 크기를 일정하게 조절하여 줌으로 인해 고가의 Bioanalyzer 등 DNA 크기 측정 장치 없이 library 제작이 가능함. 따라서 bioanalyzer를 사용하지 않는 분석 시스템을 정립하고 함.




<Bead-linked transposome을 이용한 균일한 크기의 library 제작: 출처: illumina)>

- illumina사 교육 서비스 및 연구책임자의 지도를 통해 참여 연구원들의 NGS 분석 교육을 완료하였으며, 현재 실제 NGS 분석을 실시하며 전문성을 확보하고 있음.

○ NGS 분석 사업화

- 본 NGS system을 이용한 사업화를 위해 경북대학교 내 교원겸직 제도를 활용하여 사업자등록을 진행하였으며, 학교측에 겸직 허가를 받아 2022년 12월부터 사업을 운영함.
- 2023년 7월 '노하우 기술이전'을 완료하고 관련 사업 수행을 본격적으로 시작함.



새로운 100년, 시대를 선도하는 KU
경북대학교

수신자 수신자 참조
(경유)
제목 교육공무원 겸직허가 알림<22. 11. 4.자 등>

타 교수의 겸직 허가 내용
(개인 정보 보호)

수의과대학 수의학과
조교수 권정훈
바이러스 대표 겸직을 허가함.
(결정기간: 2022. 12. 1. ~ 2024. 11. 30.)

사업자등록증

(일반과제자)
등록번호 : 310-12-27404

상 호 : 바이오진
상 명 : 권정훈 생 년 월 일 : 1987. 12. 07. 00. 00. 00
개 인 인 정 일 : 2022. 12. 29. 일
사 업 종 소 과 지 : [단기공역시 북구 (영학동 2층), 315호 수의과대학 315호(산학동, 경북대 캠퍼스)]

2022년 12월 27일
북대구세무서장

노하우기술이전계약서

<기술명: 바이러스 원종 유전체 분석 기술>


경북대학교 산학협력단이하 "경북대"라 한다(이하 바이오원이라는 "회사"라 한다)는 "경북대"가 보유한 기술을 "회사"에게 이전하고자 다음과 같이 계약을 체결한다.
[계약 주요 조건]

과제 (기여율: 100%)	과제번호	122018-2
과제기간	2022. 04. 01. ~ 2023. 12. 31.	
과제명	국제 신변종 바이러스 유전체 분석 센터 구축	
연구개발비	988,000,000 원	
1. 기술명	바이러스 원종 유전체 분석 기술	
2. 기술이전책임자	수의과대학 수의학과(부) 교수 권정훈	
3. 실시권 종류	독점실시권	
4. 계약기간	계약일로부터 4년 간	
5. 기술료	선금기술료 3,000,000 원 경상기술료 계약서상 없음	
6. 납부방법	납부방법	월(일) () () () ()
	납부일자	2023. 08. 28.까지 납부
	납부금액	3,000,000 원
납부세액	기술료명: 연구개발 세율(호): 30% (호: 33709-1) 계 단 주: 경북대학교 산학협력단	

<경북대학교 교원 겸직 허가 공문, 사업자 등록증 및 노하우기술이전계약서>

- 농림축산검역본부 해외전염병 지식발전 연구회에 연자로 참여 하여 NGS를 이용한 바이러스 전장 유전체 분석에 대한 세미나를 진행하고, 본 연구과제 및 사업화 진행에 대한 홍보를 진행함. 농림축산검역본부의 현재 요구에 부합하는 사업화인 것을 확인하고 관련 연구 협력 방안에 대해 논의함.

개인정보보호) 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.



농림축산검역본부

수신 경북대학교총장(수의과대학장)
(경유)
제목 해외전염병 지식발전연구회 연차 초청

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 농림축산검역본부에서는 바이러스 및 동물 감염성 질병과 관련하여 아래와 같이 전문가를 모시고 「해외전염병 지식발전연구회」 세미나를 개최하고자 합니다. 귀 기관의 연자가 참석할 수 있도록 협조하여 주시기 바랍니다.

가. 연자: 권정훈 교수님(경북대학교 수의과대학)
나. 일시: 2022년 10월 25일(화) 14:00-16:00
다. 장소: 농림축산검역본부 본관동 5회의실
라. 주제: complete genome sequencing of viruses using NGS

붙임 외부전문가 초청 세미나 개최 계획(권정훈 교수님) 1부. 끝.

<농림축산검역본부 세미나 관련 공문>

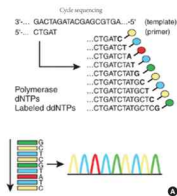
- 이외 야생동물질병관리원으로부터 조류 인플루엔자 분석 관련 시험 의뢰를 받았으나, 이는 사업자 신고 이전으로 경북대학교 산학협력단 소속으로 진행 중임.
- 질병관리청, 건국대학교 등 시험분석 의뢰를 계획하는 기관과 관련 논의를 지속하고 있음.
- 건국대학교 등에 분석 서비스를 제공하고 2023년 12월 기준 총 매출액 17,325,000원을 달성함.

○ NGS 분석 사업화 관련 기존 업체와의 차별점 및 비즈니스 모델

- 본 과제를 통해 설립된 유전체 분석 센터의 경우 기존 NGS 분석 기업과 달리 단순히 NGS 라이브러리 제작 및 기계 구동에 그치지 않고 바이러스 시료 별 전처리 방법, 양질의 결과를 얻기 위한 시료 처리 방법 등을 제시하고 NGS 결과의 분석도 수행함.
- 또한, Phylogeography 분석 등 유전체 데이터를 활용한 추가 연구와 관련된 연구 서비스를 제공하고자 함.
- iseq 100 소형 장비를 이용하여서 대부분 바이러스 연구자에게 필요한 소량의 시료를 단기간에 분석이 가능함. 대형 장비를 사용하는 기존 업체의 경우 소량의 시료를 분석하는 경우 경제성이 떨어지는 반면, iseq 100 기기의 경우 소량의 시료 처리가 가능함.
- 이 외 아래 그림과 같이 기존 연구자들과 상호 소통이 가능하고 이에 대해 전문적인 서비스가 가능하다는 점에서 기존 업체와는 큰 차별성이 있을 것으로 기대됨.

기존 기술

• 바이러스 염기서열 분석 - Sanger



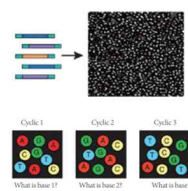
- Spike 등 주요 단백질 한정
- 소량 시료 분석
- ASF 등 대형 유전체 보유 바이러스 분석 불가
- 혼합 감염 구분 불가
- 재조합 분석 제한적

• 기존 NGS 분석 서비스

- 바이러스별 전처리 기술 없음.
- 바이러스 전용 서비스 없음.
- 바이러스 유전체 분석 결과의 phylogenetic 분석 서비스 없음.
- Phylogenetic/Phylogeography 등 전문 분석 서비스 없음.

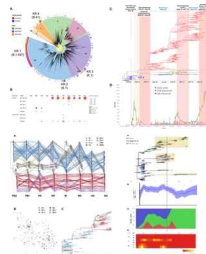
연구개발 기술

• 바이러스 염기서열 분석 - NGS



- 전장 유전체 분석 가능
- High-throughput (대량 시료 처리)
- ASF 등 대형 유전체 보유 바이러스 분석 가능
- 혼합 감염 시료 개별 유전체 분석 가능
- 재조합 분석 가능

• 바이러스 NGS 분석 표준화 및 결과 분석



- 표준화 및 국제 공동연구를 통한 NGS 이용 바이러스 분석의 보급화 및 대중화
- 유전체 빅데이터 생성 가속화
- Bayesian Phylogenetic 분석 기술을 통한 분자 역학 연구의 고도화
- 기존에 존재하지 않은 phylogenetic 분석 서비스 제공

기반 기술

1. NGS 이용 AI-ASF 전장 유전체 분석 기술
2. NGS 이용 동물 코로나바이러스 전장 유전체 분석 기술
3. 동물 바이러스 맞춤형 NGS 분석결과 조립 workflow
4. 유전체 빅데이터 활용 Phylogenetic / Phylogenetic 분석 연구
5. 바이러스 맞춤형 분석 -> 저렴한 가격으로 분석 가능 / 정확한 결과

****사업체 구성:** 교원 창업 및 겸직 가능 여부 학교측과 협의 완료

서비스 상품

1. AI-ASF 전장 유전체 분석 (전처리 포함)
2. 동물 코로나바이러스 전장 유전체 분석 (전처리 포함)
3. 기타 동물 병원체 전장 유전체 분석 (전처리 포함)
4. NGS 결과 조립 서비스
5. Phylogenetic 분석 등 추가 분석

**차별점:

- 1) 바이러스 배양액 또는 RNA/DNA 상태로 의뢰 가능
- 2) 맞춤형 조립 결과 제공
- 3) 연구자가 원하는 분석 결과 제공
- 4) Phylogenetic 분석 결과 제공

기술 수요 기관

1. 관련 대학 실험실 및 연구소
2. 관련 정부 기관
 - 질병관리청
 - 농림축산검역본부
 - 야생동물질병관리원
3. 국제 원조 사업
 - ODA 사업
 - IAEA/FAO
 - OIE

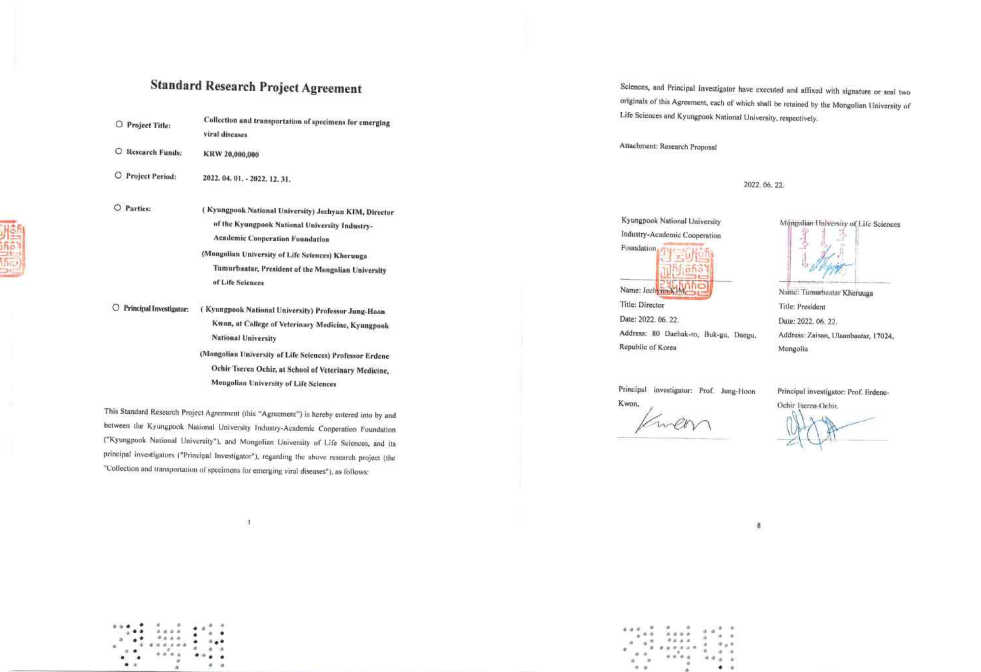
홍보 전략

- 논문 게재를 통한 분석 기술 검증
- 과제 진행 중 개발도상국 지원
- 홈페이지 제작
- 공동연구자, IAEA 등 연구 제안

2) 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축

○ 한국-몽골 간 네트워크 구성 및 몽골 시료 확보

- Mongolian University of Life Sciences와의 연구 협력 및 주요 바이러스 시료 제공에 대한 계약을 실시하고 국제공동연구사업비 2천만원을 송금함.



<경북대학교-몽골 간 2022 연구 계약 체결>

- 몽골 협력기관에서 9월 African swine fever (ASF), Avian paramyxovirus (APMV), Canine distemper virus (CDV), Canine parvovirus (CPV) 등 41건의 시료의 유전체를 수령하여 분석을 수행하였음 (표) ..

<표. Mongolian University of Life Sciences으로부터 수령한 41건의 시료 정보>

Num.	ID	Animal	Sample	Target	Result
1	CPV 1-1	canine	Cell culture	CPV2	Negative
2	CPV 1-2	canine	Cell culture	CPV2	Negative
3	CPV 4-1	canine	Cell culture	CPV2	Negative
4	CPV 4-2	canine	Cell culture	CPV2	Negative
5	CPV 5-1	canine	Cell culture	CPV2	Positive
6	CPV 5-2	canine	Cell culture	CPV2	Positive
7	ASF-1	swine	Tissue	ASFV	Negative
8	ASF-2	swine	Tissue	ASFV	Negative
9	ASF-3	swine	Tissue	ASFV	Positive
10	ASF-4	swine	Tissue	ASFV	Positive
11	EIV-1	equine	allantoic fluid	APMV	Negative
12	362	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
13	607	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
14	67	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
15	13	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
16	40	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
17	SL-1	snow leopard	whool blood	N/A	Undetected
18	SL-2-G	snow leopard	tissue	N/A	Negative
19	SL-3-P	snow leopard	tissue	N/A	Negative

20	SL-4-L	snow leopard	tissue	N/A	Negative
21	PPR-1	goat	tissue	PPRV	Negative
22	CDV-1	canine	swab	CDV	Negative
23	CDV-2	canine	swab	CDV	Positive
24	85	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
25	86	wild bird	allantoic fluid	APMV	Negative
26	c-1	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
27	c-2	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
28	c-3	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
29	c-4	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
30	c-5	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
31	c-6	chicken	allantoic fluid	IBV, APMV and AIV	Negative
32	NK137201	small mammal	swab	N/A	Undetected
33	NK317789	small mammal	swab	N/A	Undetected
34	NK317547	small mammal	swab	N/A	Undetected
35	NK137156	small mammal	swab	N/A	Undetected
36	NK137153	small mammal	swab	N/A	Undetected
37	NK317615	small mammal	swab	N/A	Undetected
38	NK316987	small mammal	swab	N/A	Undetected
39	NK317256	small mammal	swab	N/A	Undetected
40	NK317676	small mammal	swab	N/A	Undetected
41	NK318395	small mammal	swab	N/A	Undetected

- 야생조류, 닭 및 말에서 분리한 시료의 경우 혈구 응집 반응을 보이거나 조류 인플루엔자 및 뉴캐슬병에 음성을 나타낸 시료로 avian avulavirus (avian paramyxovirus)로 의심됨.
- 눈표범 (snow leopard) 및 소형 설치류 시료의 경우 특정 병원체가 확인되지 않았으나 NGS 분석을 통해 신규 야생동물 병원체를 탐색하였으나 확인되지 않았음
- 몽골에서 수령한 canine distemper virus (CDV), canine parvovirus (CPV) 시료의 전장 유전체를 이용해 maximum-likelihood (ML) phylogenetic analysis를 수행함
- CDV는 아시아(몽골, 중국 등)에서 분리된 바이러스 (CDV/Mongolia/CDV_Dog1_mongolia/2021, CDV/Mongolia/CDV_Dog2_Mongolia/2021, CDV/China/HL006/2014 등)와 cluster를 이루었음 (그림).
- CPV는 아시아(몽골, 중국 등)에서 분리된 바이러스 (CPV/Mongolia/5MGL/2017, CPV/China/HN-017/2020, CPV/China/HN-002/2020 등)와 cluster를 형성 (그림).

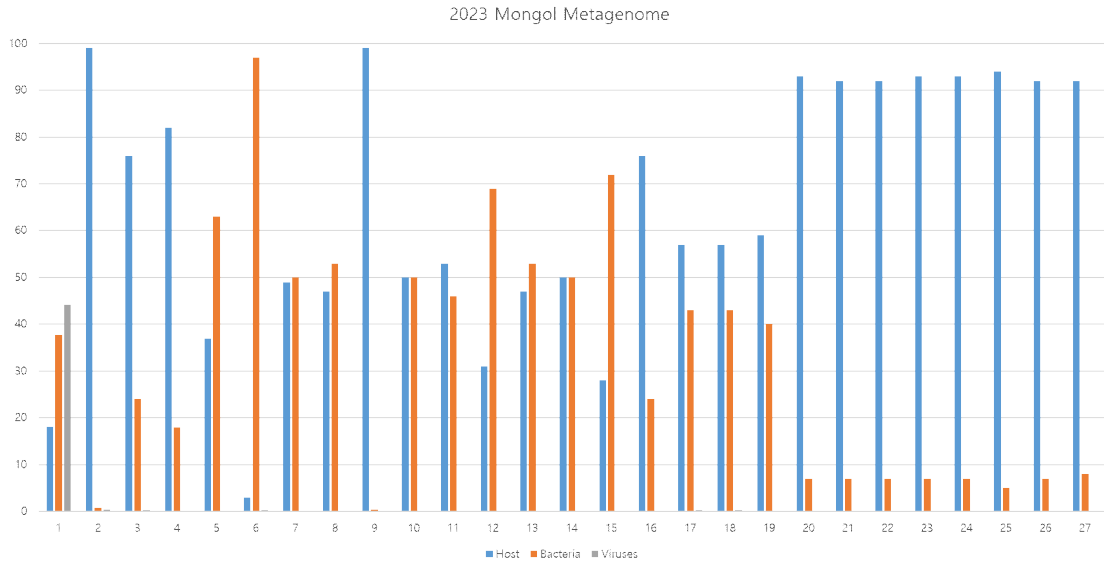


<그림. CDV (위), CPV (아래)의 전장 유전체를 이용한 ML tree>

<표. Mongolian University of Life Sciences으로부터 2차 수령한 41건의 시료 정보>

Num.	ID	Animal	Sample	Target	Result
1	1	Goat	Cell culture supernatant	Goat pox	Positive
2	2	Sheep	Cell culture supernatant	Sheep pox	Positive
3	3	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Negative
4	4	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Positive
5	5	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Negative
6	6	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Positive
7	7	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Negative
8	8	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Positive
9	9	Tick	Cell culture supernatant	TBEV	Positive
10	10	Sheep	Lung tissue	Maed-visna	Positive
11	11	Sheep	Lung tissue	Maed-visna	Positive
12	12	Sheep	Lung tissue	Ovine pulmonary adenomatosis	Positive
13	13	Sheep	Lung tissue	Ovine pulmonary adenomatosis	Positive
14	14	Sheep	Lung tissue	Ovine pulmonary adenomatosis	Positive
15	15	Sheep	Lung tissue	Ovine pulmonary adenomatosis	Positive
16	16	Horse	Spleen tissue	EIV	Negative
17	17	Goat	Blood	Small ruminant lentivirus	Positive
18	18	Goat	Blood	Small ruminant lentivirus	Positive
19	19	Goat	Blood	Small ruminant lentivirus	Positive
20	20	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
21	21	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
22	22	Dog	Blood	CDV and CPV	CPV Positive
23	23	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
24	24	Dog	Blood	CDV and CPV	CPV Positive
25	25	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
26	26	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
27	27	Dog	Blood	CDV and CPV	Negative
28	28	Dog	Blood	CDV and CPV	
29	1	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
30	33	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
31	34	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
32	38	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
33	39	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
34	41	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
35	126	wild bird	Allantoic fluid	AIV	
36	139	Goat	Tissue	PPRV	
37	141	Goat	Tissue	PPRV	
38	144	Goat	Tissue	PPRV	
39	165	Goat	Tissue	PPRV	
40	172	Goat	Tissue	PPRV	
41	184	Goat	Tissue	PPRV	

- 야생조류, 닭 및 말에서 분리한 시료의 경우 혈구 응집 반응을 보이거나 조류 인플루엔자 및 뉴캐슬병에 음성을 나타낸 시료로 avian avulavirus (avian paramyxovirus)로 의심됨.
- 몽골의 양, 염소, 진드기, 말, 개 시료를 분석한 결과 분석된 27개 시료 중 17개 시료에서 양성 확인
- 개 시료의 경우 CDV (Canine distemper virus)는 발견되지 않았지만, 2개의 시료에서 CPV (Canine parvovirus) 확인.
- 1번 시료를 제외한 26개 시료는 바이러스의 비율이 0.3% 이하로 측정되어 전장유전체의 확보는 어려울 것으로 판단되나, 질병의 유무는 판단 가능한 정도로 측정되어 추가적인 전처리 과정이 이루어진다면 metagenomic를 활용한 병원체의 유무 판단은 가능할 것으로 판단됨.



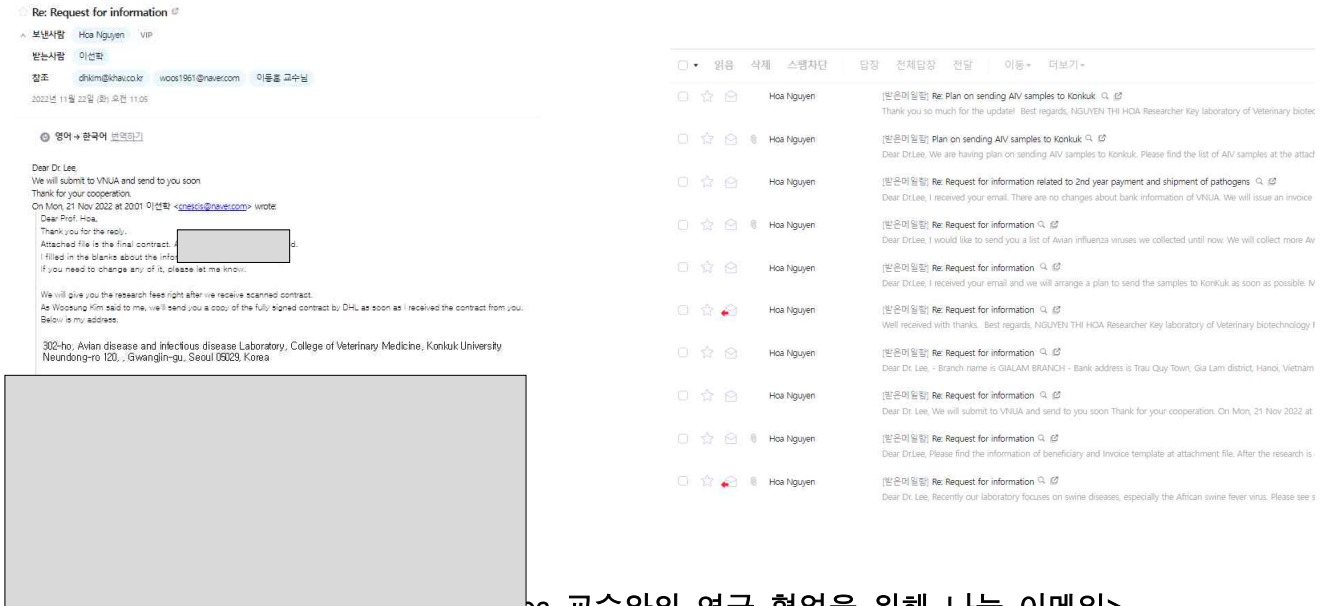
<그림. 몽골 시료 NGS 결과 Host, Bacteria, Virus 비율>



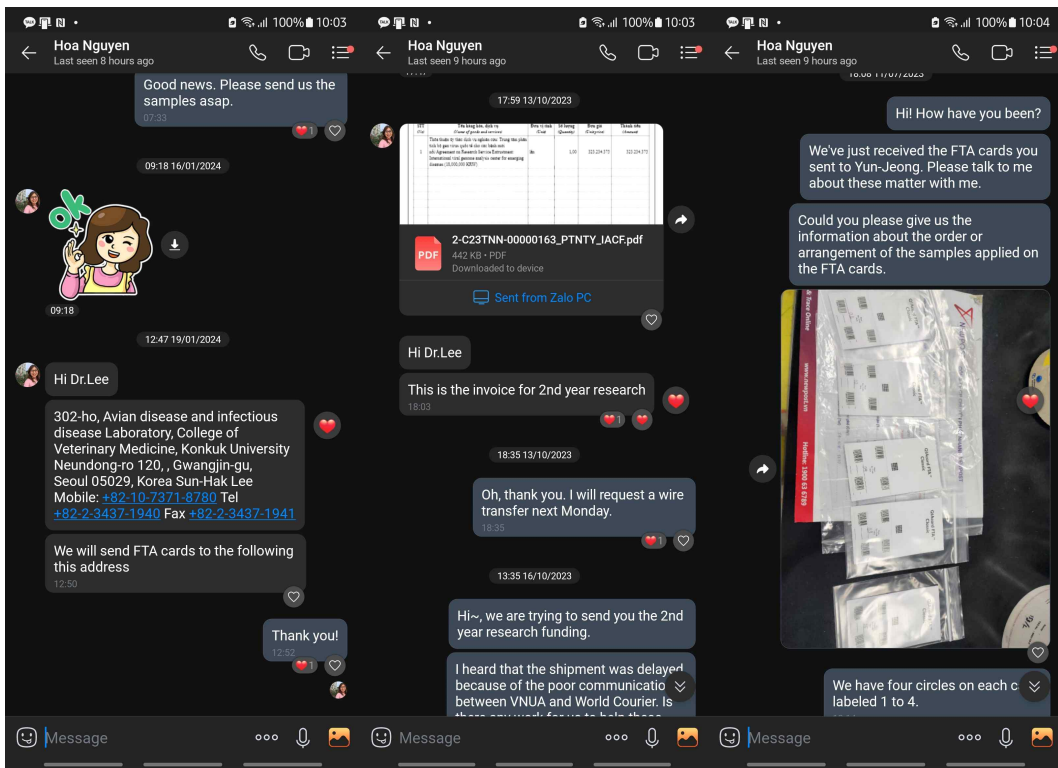
<그림. 몽골 시료 NGS 결과 1번 시료 Host, Bacteria, Virus 비율>

○ 한국(건국대학교)-해외 (베트남, 브라질, 인도네시아, 캄보디아, 잠비아, 인도, 이란) 간 네트워크 구성 및 공동연구

a) 베트남



<그림. 베트남 Nguyen Thi Hoa 교수와의 연구 협업을 위해 나눈 이메일>



<그림. Zalo를 이용한 시료 정보 및 수송 일정 등 공유>

수입허가증명서
(CERTIFICATE FOR IMPORT PERMIT)

수입허가번호 Import permit No.	2023-6644
수입허가일자 Date of issue	2023.09.22.

「가축전염병 예방법」 제32조 및 동법 시행규칙 제32조제3항의 규정에 따라 아래와 같이 수입허가를 받은 것임을 증명합니다.
This is to certify that import permit was obtained as the following, in accordance with Article 32 of "Livestock Epidemic Prevention and Control Act" and Item 3 of Article 32 of "its Enforcement Ordinance".

신청인 성명·주소 (Name & Address of applicant)	건국대학교 수의과대학 남상십 서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교 수의학과 415호
동물의 종류·품종 또는 물품의 종류 (Species of animal or Kind of article)	Low pathogenic avian influenza virus H9N2
두수 또는 수량 (Total head or quantity)	총 6 vials
보내는 사람의 성명·주소 (Name & Address of consignor)	Kyuyen Thi Hoa / Key laboratory veterinary biotechnology. Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy, GiaLam, Hanoi, VietNam

※ 주의(Remarks)

- 위의 동물 또는 물품의 발송 시에는 이 증명서를 첨부하여야 합니다.
In consigning the above animals or packages in which the above articles are packed, they should be accompanied with this certificate.
- 보내는 사람은 위의 화물을 이 증명서와 같이 뒤쪽에 기재된 농림축산검역본부(지역본부 또는 사무소)로 발송하여야 합니다.
The consignor should address the above commodities to the Animal and Plant Quarantine Agency(or regional office or district office thereof) indicated on the back of this certificate along with this certificate.

3. 받는 사람은 위의 화물을 농림축산검역본부(지역본부 또는 사무소)가 행한 검사를 받은 후 수령하여야 합니다.

The consignee should receive the above commodities after the completion of inspection at the above Animal and Plant Quarantine Agency(or regional office or district office thereof).

농림축산검역본부장



ANIMAL AND PLANT QUARANTINE AGENCY REPUBLIC OF KOREA OFFICIAL SEAL.

도착예정일 : 2023.09.
(Estimated date of arrival)

도착항 : 인천국제공항
(Arrival port) : Incheon International Airport

농림축산검역본부 : 경상북도 김천시 혁신로 177 (우)39660
(Animal and Plant Quarantine Agency) : 177, Hyeoksins 8-ro, Gimcheon-si,
Gyeongsangbuk-do, 39660, Republic of Korea

<그림. 베트남 H9N2 LPAIV 시료 수입허가증명서>

- 베트남 농업대학 (Vietnam National University of Agriculture) Nguyen Thi Hoa 교수와의 협업을 통해 국제협력 네트워크를 구축함. Hoa 교수 연구실은 30종 이상의 조류인플루엔자를 보유하고 있으며, 뉴캐슬병 바이러스, 전염성기관지염 바이러스 등 다양한 바이러스를 보유함. 조류인플루엔자의 경우, H9N2 조류인플루엔자를 다수 보유하나 유전자 분석이 미미한 실정임. 본 연구를 통해 해당 바이러스에 대한 유전자 분석 및 역학조사를 진행함.

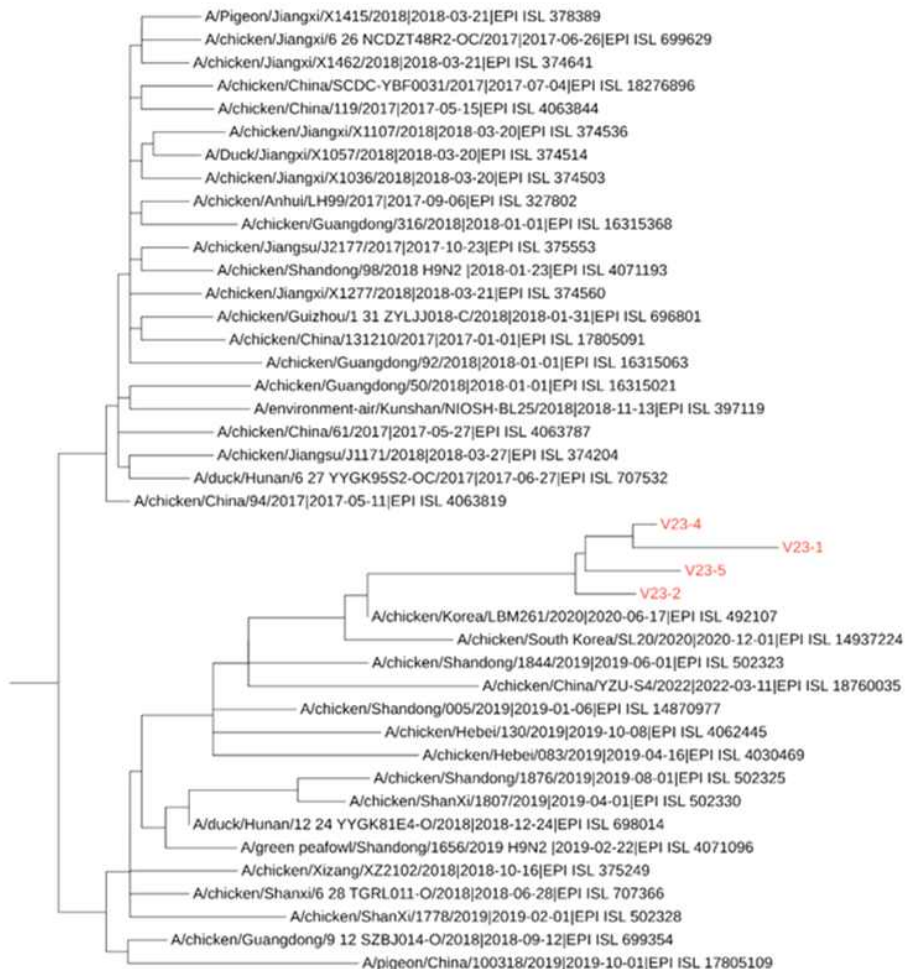
<표. 베트남 가금류 분리 병원체 목록 (하늘색: HPAI 의심시료, 녹색: H9N2 LPAI 시료)>

No	Sample collection date	Code	Species	Sample's type	Place (Province)	Genotyping	Hour post	HA (log2)	Amount	Storage
1	26/02/2017	AI 1	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H5N1	24	10	1	Freeze -80° C
3	02/11/2020	AI 3	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H5N6	24	9	1	Freeze -80° C
6	03/01/2022	AI 6	Duck	Brain and lung	Hai Duong	A/H5N1	48	7	1	Freeze -80° C
7	14/03/2022	AI 7	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	48	8	1	Freeze -80° C
8	17/03/2022	AI 8	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A	24	7	1	Freeze -80° C
9	24/03/2022	AI 9	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	48	6	1	Freeze -80° C
10	25/03/2022	AI 10	Duck	Brain and lung	Ha Nam	A/N1	36	7	1	Freeze -80° C
11	01/04/2022	AI 11	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/H5N1	48	8	1	Freeze -80° C
12	01/04/2022	AI 12	Chicken	Brain and lung	Thai Nguyen	H5N1	36	7	1	Freeze -80° C
13	15/04/2022	AI 13	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	48	5	1	Freeze -80° C
14	10/05/2022	AI 14	Chicken	Brain and lung	Hai Phong	A/H5N1	48	8	1	Freeze -80° C
15	13/05/2022	AI 15	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A/H5N1	48	6	1	Freeze -80° C
16	13/05/2022	AI 16	Duck	Brain and lung	Hung Yen	A/H5N1	48	7	1	Freeze -80° C
17	16/05/2022	AI 17	Chicken	Brain and lung	Hai Phong	A/H5N1	48	8	1	Freeze -80° C
18	18/05/2022	AI 18	Duck	Brain and lung	Hoa Binh	A/H5N1	48	7	1	Freeze -80° C
19	22/05/2022	AI 19	Chicken	Brain and lung	Hoa Binh	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
20	23/05/2022	AI 20	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/H5N1	24	8	1	Freeze -80° C
21	27/05/2022	AI 21	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	24	6	1	Freeze -80° C
22	27/05/2022	AI 22	Duck	Brain and lung	Hung Yen	A/N1	36	7	1	Freeze -80° C
23	06/06/2022	AI 23	Duck	Brain and lung	Hung Yen	A/N1	48	3	1	Freeze -80° C
24	23/06/2022	AI 24	Duck	Brain and lung	Ha Nam	A/H5N1	48	7	1	Freeze -80° C
25	23/06/2022	AI 25	Chicken	Brain and lung	Nam Dinh	A/H5N1	24	6	1	Freeze -80° C
26	25/06/2022	AI 26	Chicken	Brain and lung	Nam Dinh	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
27	09/07/2022	AI 27	Duck	Brain and lung	Bac Ninh	A/N1	48	6	1	Freeze -80° C
28	11/07/2022	AI 28	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	36	7	1	Freeze -80° C
29	11/07/2022	AI 29	Duck	Brain and lung	Quang Ninh	A	24	7	1	Freeze -80° C
30	12/07/2022	AI 30	Duck	Brain and lung	Hai Phong	A	24	7	1	Freeze -80° C
31	27/07/2022	AI 31	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	48	8	1	Freeze -80° C

32	27/07/2022	AI 32	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A	24	6	1	Freeze -80° C
33	01/08/2022	AI 33	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H5	48	8	1	Freeze -80° C
34	01/08/2022	AI 34	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/H5	36	7	1	Freeze -80° C
35	01/08/2022	AI 35	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	48	8	1	Freeze -80° C
36	02/08/2022	AI 36	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	48	7	1	Freeze -80° C
37	03/08/2022	AI 37	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	48	6	1	Freeze -80° C
38	08/08/2022	AI 38	Duck	Brain and lung	Bac Giang	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
39	17/08/2022	AI 39	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	24	6	1	Freeze -80° C
40	17/08/2022	AI 40	Chicken	Brain and lung	Hung Yen	A/N1	24	7	1	Freeze -80° C
41	17/08/2022	AI 41	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A	24	4	1	Freeze -80° C
42	18/08/2022	AI 42	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/N1	48	10	1	Freeze -80° C
43	22/08/2022	AI 43	Duck	Brain and lung	Hung Yen	A/N1	24	5	1	Freeze -80° C
44	22/08/2022	AI 44	Chicken	Brain and lung	Thanh Hoa	A/H5N1	24	8	1	Freeze -80° C
45	22/08/2022	AI 45	Chicken	Brain and lung	Hai Duong	A/N1	24	8	1	Freeze -80° C
46	22/08/2022	AI 46	Chicken	Brain and lung	Thanh Hoa	A/H5N1	48	6	1	Freeze -80° C
47	23/08/2022	AI 47	Chicken	Brain and lung	Nghe An	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
49	25/08/2022	AI 49	Duck	Brain and lung	Vinh Phuc	A/N1	48	6	1	Freeze -80° C
50	01/09/2022	AI 50	Duck	Liver and spleen	Ha Nam	A/H5N1	24	6	1	Freeze -80° C
51	05/09/2022	AI 51	Goose	Brain and lung	Thai Nguyen	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
52	05/09/2022	AI 52	Duck	Brain and lung	Bac Giang	A/H5N1	24	6	1	Freeze -80° C
54	14/09/2022	AI 54	Duck	Brain	Thai Nguyen	A/H5N1	48	8	1	Freeze -80° C
55	20/09/2022	AI 55	Duck	Brain and lung	Thai Nguyen	A/H5N1	24	7	1	Freeze -80° C
56	21/09/2022	AI 56	Duck	Brain	Thai Nguyen	A/H5N1	48	8	1	Freeze -80° C
57	24/09/2022	AI 57	Duck	Brain	Thai Nguyen	A/H5N1	24	8	1	Freeze -80° C
58	24/09/2022	AI 58	Duck	Brain and lung	Bac Giang	A/H5N1	24	9	1	Freeze -80° C
59	26/10/2022	AI 59	Duck	Brain and lung	Quang Ninh	A/H5N1	48	9	1	Freeze -80° C
60	27/10/2022	AI 60	Duck	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	48	7	1	Freeze -80° C
61	27/10/2022	AI 61	Chicken	Brain and lung	Bac Ninh	A/N1	24	7	1	Freeze -80° C
62	28/10/2022	AI 62	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	24	7	1	Freeze -80° C
63	01/11/2022	AI 63	Duck	Brain and lung	Hung Yen	A	24	8	1	Freeze -80° C
64	12/11/2022	AI 64	Goose	Brain and lung	Nghe An	A	24	7	1	Freeze -80° C
65	18/11/2022	AI 65	Chicken	Lung	Thai Nguyen	A	48	11	1	Freeze -80° C
66	21/11/2022	AI 66	Chicken	Brain and lung	Thai Nguyen	A	24	6	1	Freeze -80° C
68	25/11/2022	AI 68	Chicken	Brain and lung	Hung Yen	A	48	7	1	Freeze -80° C
69	27/11/2022	AI 69	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A	48	7	1	Freeze -80° C
70	29/11/2022	AI 70	Chicken	Swab	Nam Dinh	A	24	4	1	Freeze -80° C
71	14/12/2022	AI 71	Chicken	Brain and lung	Hung Yen	A	48	7	1	Freeze -80° C
72	11/01/2023	AI 72	Chicken	Brain	Hung Yen	A	48	7	1	Freeze -80° C
73	24/03/2023	AI 73	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/H5N1	36	7	1	Freeze -80° C
74	08/04/2023	AI 74	Duck	Brain and lung	Thanh Hoa	A/H5N1	48	6	1	Freeze -80° C
75	04/05/2023	AI 75	Duck	Brain	Thai Nguyen	A/H5N1	36	7	1	Freeze -80° C
76	08/05/2023	AI 76	Chicken	Brain and lung	Hai Duong	A/N1	24	7	1	Freeze -80° C
77	10/05/2023	AI 77	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H5	24	7	1	Freeze -80° C
78	10/05/2023	AI 78	Chicken	Brain and lung	Bac Giang	A/N1	36	7	1	Freeze -80° C
79	15/05/2023	AI 79	Duck	Brain and lung	Ha Noi	A/N1	24	7	1	Freeze -80° C
80	19/05/2023	AI 80	Duck	Brain and lung	Bac Ninh	A/N1	36	7	1	Freeze -80° C
2	01/03/2018	AI 2*	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/H9N2	48	10	1	Freeze -80° C
4	02/11/2020	AI 4*	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H9N2	24	9	1	Freeze -80° C
5	04/05/2021	AI 5*	Chicken	Brain and lung	Ha Nam	A/H9N2	48	8	1	Freeze -80° C
48	23/08/2022	AI 48*	Chicken	Brain and lung	Hai Phong	A/H9N2	24	5	1	Freeze -80° C
53	09/09/2022	AI 53	Chicken	Brain and lung	Hung Yen	A/H9N2	48	7	1	Freeze -80° C
67	22/11/2022	AI 67*	Chicken	Brain and lung	Ha Noi	A/H9N2	24	7	1	Freeze -80° C

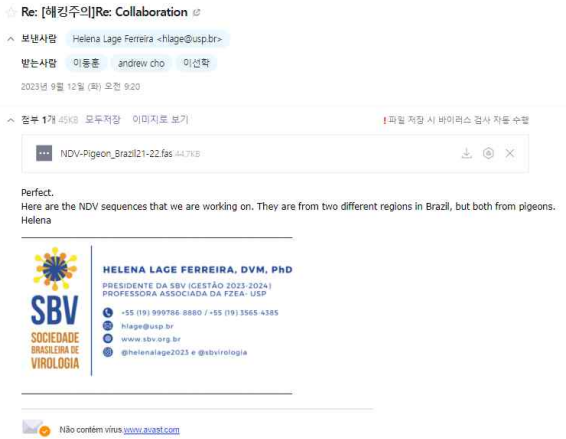
- 베트남 유래 샘플에서 NGS를 진행하여 얻어진 전장유전체 정보를 통해 H9N2를 선별함. 샘플의 HA 유전자 정보를 이용해 ML phylogenetic tree 분석을 진행함. GISAID database에서 BLAST를 진행하여 200개의 reference sequence를 추출한 뒤 유사도 99.7% 이상의 sequence를 제외하여 38개를 선정한 것을 이용하여 raxmlGUI로 ML tree를 작성함.
- 분석 결과 베트남 가금 유래 샘플(V23-1, 2, 4, 5)은 Y280 lineage에 속하며 2020년 국내 가금시장 및 농장 등에서 분리된 Y280 lineage와 유전적 거리가 가장 가까운 것으로 확인됨. 한국 다음으로 중국의 2018-2019년 Y280 lineage와 가까웠으며, 해당 cluster 내에는 2022년 중국 가금농장 분리 H9N2도 포함되어 있음.
- 이는 H9N2 Y280 lineage 바이러스가 중국과 한국 등을 경유하여 베트남 가금농장에 전파되었을 가능성을 시사하며, 해당 바이러스주가 2018년부터 최소 2022년까지 중국 내에서 가금농장 사이의 전파를 통해 유지되고 있음을 의미함.

Tree scale: 0.01



<그림 . 베트남 유래 H9N2 아형 HA 유전자를 이용한 ML tree 결과>

b) 브라질



<그림. Helena Lage Ferreira 교수와의 시료 분석 협업을 위한 메일 Invoice 관련 (원) 및 계약서 관련 (오)>



Entrustment Research Service Agreement

Industry-Academic Cooperation Foundation of Konkuk University (hereinafter referred to as "A") and Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ (hereinafter referred to as "B") shall be entered into a contract as following with respect to "International viral genome analysis center for emerging diseases" (hereinafter referred to as "Research").

Article 1 (Purpose and Scope of Entrustment Research)

The purpose of this contract is to prescribe all of necessary matters for "A" to entrust the research to "B", and for "B" to perform it. The scope of this research is to performing the research commissioned by "A" under the responsibility of "B", and the scope of other detailed research is included in the attached "Research Plan".

Article 2 (Period)

The term of this contract shall be 14 months from 1st November 2022 to 31st December 2023, and it can be adjusted by agreement between the two parties.

Article 3 (Research Fund)

The net value at the expenses required for this research is 36,000,000 Won (KRW 36,000,000), and "A" pays it to "B" as follows. (VAT is included). "B" will issue invoices in dollars.

- 1st payment (50%): 18,000,000 Won. (Until 30th November 2022).
- 2nd payment (50%): 18,000,000 Won. (Until 30th April 2023).

"B" will make payments in accordance with the research project. On a gross revenue of project it will be collected a rate of 2.5% for the University and 6% for the FZEA/USP. An administration fee of 10% (ten percent) will also be collected from the total amount in favor of FEALQ.

Article 4 (Report of Research Outcomes)

"B" shall submit a report on the results of this research and the outcomes to "A" after the research is completed

Article 5 (Attribution of Research Results)

① Research equipment, research facilities and tangible outcomes such as prototypes obtained as a result of performed this projects shall be owned by "A". However, in the event that it's

Unassign Envelope ID: 91A1U126-L345-472U-8A81-7-CLJ3M4LCP-989

The matters not specified in this contract or any objection to the interpretation of this contract shall be subject to the agreement of both parties or common practice.

Article 12 (Court of Competent Jurisdiction)

The litigation for the settlement of disputes related to this contract shall be filed with the Seoul Central District Court. The competent court may be changed if the parties agree that.

Attachment: 1 copy of R&D plan.

29th . November . 2022

"A" Address: 120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul
 Name of Organization: Industry-Academic Cooperation Foundation (IACF) of Konkuk University
 Representative: Head of IACF, Yoon Dongyeol (Seoul)
 Manage of Research Nahm Sang-Seop

"B" Address: Av. Centenário, 1.080 Bairro São Dimas, ZIP CODE 13416-000, Piracicaba - SP, Brazil.
 Name of Organization: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ
 Representative: Paula Arizeni, Ana Flávia de Faria Guimarães

<그림. 브라질과의 정보교환을 위한 invoice>

- 브라질 상파울로 대학(Universidade de São Paulo) Helena Lage Ferreira 교수와의 협업을 통해 국제협력 네트워크를 구축함. 현재 대학에서는 30종 이상의 뉴캐슬병 바이러스, 조류인플루엔자 바이러스, 전염성기관지염 바이러스를 보유 중이며, 본 연구를 통해 분석함.
- 브라질 상파울루 대학에 헬레나 페레이라 교수팀으로부터 2023년 6월경 브라질에서 발견된 4종의 제비갈매기 폐사체에서 분리된 clade 2.3.4.4 b H5N1아형 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 전장 유전체 3건을 공유받아 고병원성 조류 인플루엔자의 브라질

유입 경로, 유입 시기, 포유류 감염 능력등을 분석함.

MS H6N2 to MRA

보낸사람 Helena Lage Ferreira <hlage@usp.br>

받는사람 이동훈 andrew cho (7rewcho@gmail.com) 이선학

2024년 2월 14일 (수) 오후 9:55

영어 → 한국어 번역하기

Dear Sun-Hak,

I hope you're well!

More than six months ago, we sent our manuscript on detecting and characterizing the H6N2 virus in Santa Catarina state, Brazil, to the Journal Frontiers in Veterinary Science, but it was rejected. The article identifies low pathogenicity avian influenza viruses without any reassortments, so submitting it to a journal as a genome report would be more appropriate. Therefore, I am forwarding the article in a shorter version than the one you approved for submission to ASM's Microbiology Resource Announcements (MRA). If anyone objects to this submission or has any changes, please don't hesitate to contact me by Friday. I apologize for the short notice.

Thanks again for your cooperation and excellent work!

Best,

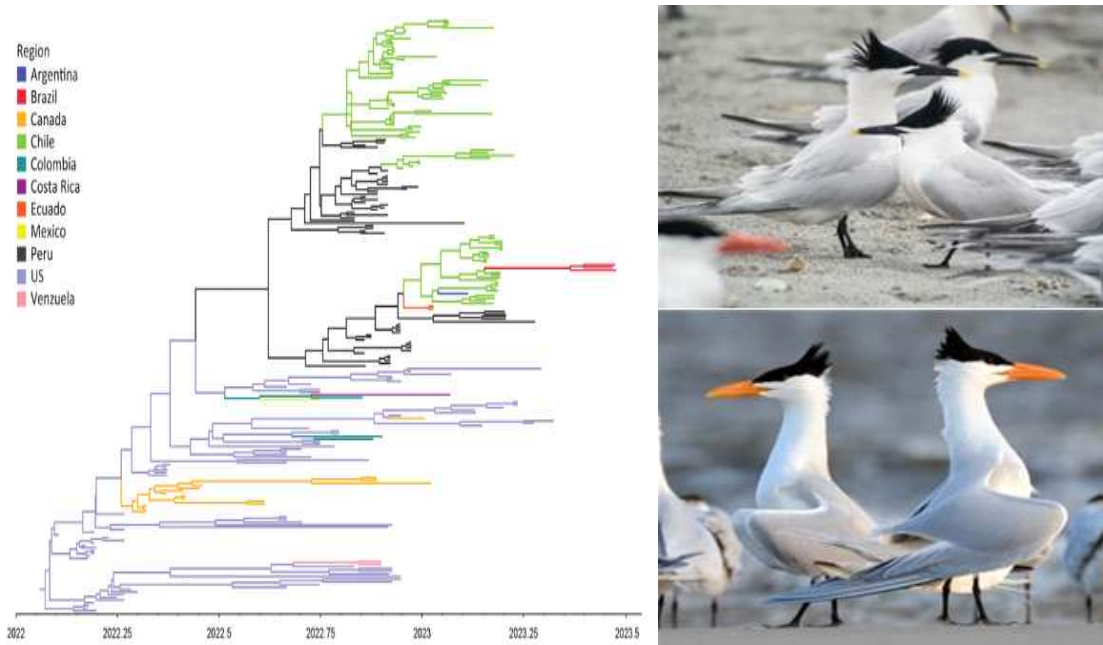
Helena



Helena Lage Ferreira
Presidente, SBV (Gestão 2023-2024)
+55 (19) 3565-4385 | +55 (19) 99786-8880 | www.sbv.org.br
hlage@usp.br

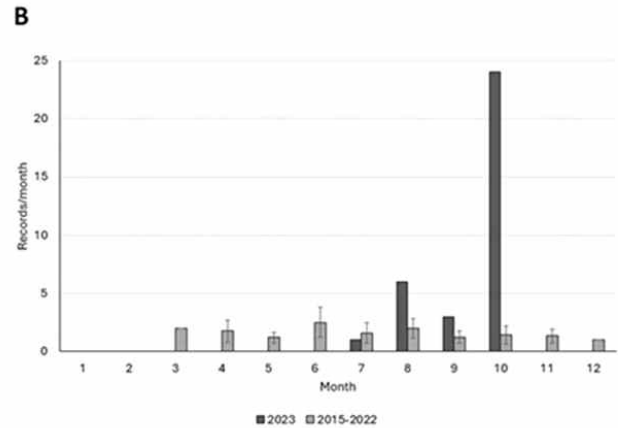
Powered by WiseStamp

<그림. Helena Lage Ferreira 교수와의 H6N2 LPAI 바이러스 분석을 위한 정보 교류>



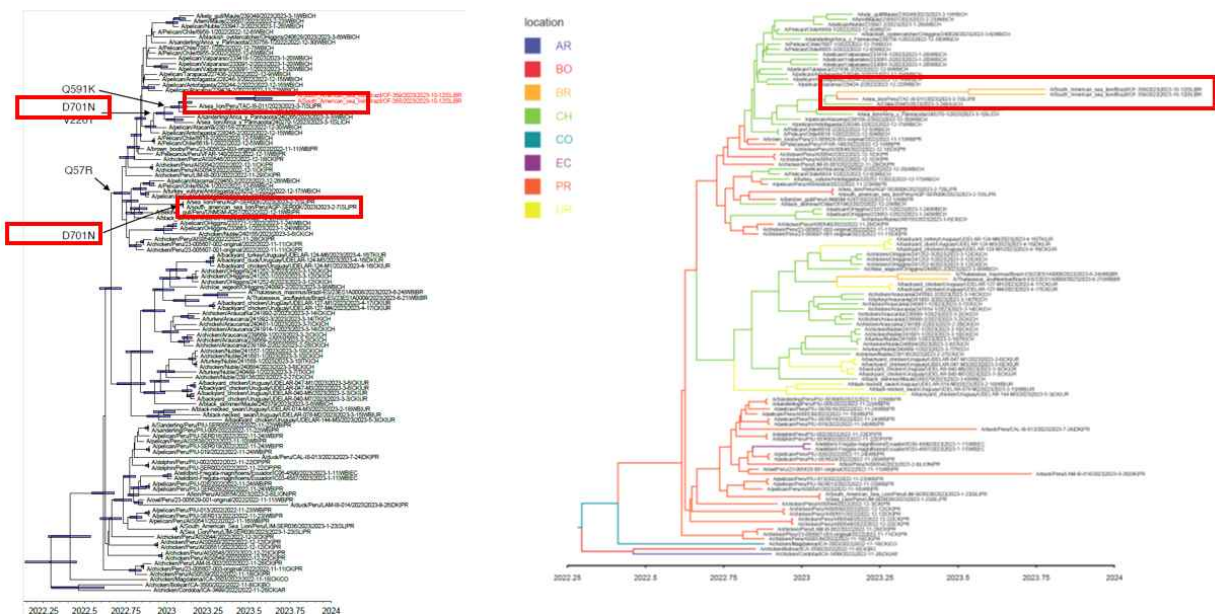
<그림. Bayesian 계통지리학 분석법을 사용한 브라질 분리 clade 2.3.4.4b H5N1 HPAI 계통수(왼)와 폐사체로 발견된 샌드위치 제비갈매기(오른쪽위) 와 로알턴(오른쪽아래)>

- Bayesian 계통지리학 분석법을 이용하여 clade 2.3.4.4 b H5N1 아형 고병원성 조류 인플루엔자는 2022년도 북미 지역에서 유행한 균주가 재조합을 거치지 않고, 중미와 남미 국가에 차례로 유입되었고, 태평양에 맞닿아 있는 북남미 국가, 페루 칠레 등을 거쳐 브라질로 유입된 것으로 밝혀짐.
- 남미 유입과 겹쳐 칠레에서는 최초로 같은 유전형의 고병원성 조류 인플루엔자에 의한 포유류감염 사례가 보고되었는데, 브라질 제비갈매기 폐사체에서 분리된 고병원성 조류 인플루엔자와 상당수의 포유류 감염 관련 아미노산 변이를 공유하고 있음을 확인함.



<그림. 2023년 10월 브라질 해안가에서 발견된 남미 바다사자 사체(왼), 기존 바다사자 폐사체 보고량과 비교한 2023년도 바다사자 폐사체 보고량 비교 (오)>

- 2023년 6월 브라질 야생조류 폐사체에서 분리된 clade 2.3.4.4 b H5N1아형 고병원성 조류 인플루엔자에 이어 2023년 10월경 브라질 대서양 해안가에서 전례없는 바다사자 개체군의 폐사체가 보고되며 7월부터 서서히 증가하며 10월경 역대 최고치를 기록함. 이에 브라질 상파울루 대학 헬레나 페레이라 교수팀에서는 야생 바다사자 폐사체에서 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스를 분리하였고, 전장유전체를 분석하여 건국대학교 이동훈 교수팀과 공동연구를 진행함.
- 브라질 바다사자에서 분리한 고병원성 조류 인플루엔자 전장유전체 분석 결과 기존 6월 경에 유입된 바이러스와 구별되며 신규하게 칠레를 통해 다시 유입되었음을 확인함. 남미 국가간 바이러스 전파와 교환이 이루어지고 있으며, 앞으로 지속적인 감시 모니터링으로 바이러스 전파 관찰할 필요성이 있음.



<그림. Bayesian 계통수 분석법을 사용한 브라질 바다사자 분리 clade 2.3.4.4b H5N1 HPAI 계통수(왼)와 Bayesian 계통지리학 분석법을 적용한 계통수 (오)>

- 바다사자 유래 고병원성 조류 인플루엔자의 전장유전체 단백질 서열을 분석을 진행함. 현시점까지 발생한 남미의 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 포유류감염 관련 아미노산 변이를 비교분석한 결과 기존 브라질 제비 갈매기 유래 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스보다 더 많은 포유류감염 관련 아미노산이 관찰됨. 또한, 다른 국가의 바이러스들

과 포유류감염 관련 인자를 보유하여 추가적인 분석을 진행한 결과, 같은 변이를 보유한 바이러스들이 서로 다른 경로로 변이를 획득하였을 것으로 추정되며, 이는 포유류감염 관련 변이가 야생동물에서 유지 및 축적 되고 있음을 확인함.

Substitution	HA (H5 numbering) *										PB2†		PA*			M1*			NS**						
	D94N	S123A	S133A	S154N	T156A	T188I	V210I	Q222L	G224S	L89V	D258G	Q591K	E627K	D701N	R57Q	A515T	N30D	I43M	T215A	P42S	S87P	80-84 deletion	E5EV	A223E	V226T
Brazilian wild bird isolates	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	D	R	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	I
A/Chile/2945/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	K	E	N	Q	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	T
Brazilian Sw. flu isolates	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	K	E	N	Q	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	T
A/England/Peru/PIU-SER002/2022	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	D	R	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	I
A/India/Peru/Arca.y.P.12162022/240270-1/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	N	Q	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	T
A/India/Peru/Indo.Lim/Peru/LIM-SER036/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	D	R	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	I
A/India/Peru/Peru/AGP-SER00K/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	N	Q	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	I
A/India/Peru/Peru/TAC-INS-011/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	K	E	N	Q	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	T
A/India/Peru/Peru/AIS054/2023	S	P	A	N	A	T	A	Q	G	V	D	Q	E	D	R	T	D	M	A	S	P	TIASV	E5EV	E	I

<그림. 남미 분리 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 포유류 감염 관련 아미노산 변이>

c) 인도네시아

FROM : Account Nr DHL: 540374485
PT VAKSINDO SATWA NUSANTARA
Inna Herliana
JL. BAROKAH KP BARU RT 001 RW 008 WANAHERANG
BOGOR, GUNUNG PUTRI 16965
INDONESIA
ID
Phone : 620218670414
Shipp. VAT:
Reference :

PRODUCT: **TDY** *Reproduction*

DESTINATION: **SEL**

AIR WAYBILL: 4523750372
(Non-Vegitable)

TO :
Veterinary Collage in Konkuk University
Mr. Chang-Seon Song
302(F) Veterinary collage in Konkuk University
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu
Seoul, Republic of Korea
SEOUL 05029
KOREA, REPUBLIC OF (SOUTH K.)
KR
Rec. VAT:
Phone : 821099134103

DESCRIPTION: DATE: 2023-01-20
6 Unit Sample of Reagen
VALUE: 30.000 USD WEIGHT: 11.740 KG

Additional Info : Pick-up time + route : 10:24 2023-01-20 - Extra charges
Bill to account : 540374485 Dimensions (cm) : L: 53.0 W: 39.0 H: 35.0 1: DO 2900000.000 IDR
DHL Service : Duties Taxes Paid Volumetric weight : KG 2: WY
Reason for export : Customer weight : 11.740 KG
Insurance value : Actual weight :
Duty and Tax account : 540374485

AWB No. 452 375 037 2 Page 2

JAPFA

PT VAKSINDO SATWA NUSANTARA
MANUFACTURER OF VETERINARY VACCINES
Wisma Mitani 5th Floor, Jl. MT. Haryono Kav. 16, Jakarta - 12810, Indonesia
Plant 1 : Jl. Mercedes Benz No.12 Cicadas, Gunung Putri Bogor - 16964, Indonesia
Plant 2 : Jl. Barokah No.7 Wanaherang, Gunung Putri Bogor - 16965, Indonesia
Tel: +62-21 867 0414 Fax: +62-21 867 2501 Website: www.vaksindo.co.id

TO :
Chang-Seon Song
Deok Hwan Kim
302(F), Veterinary collage in Konkuk
University, 120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu,
Seoul, Republic of Korea

NON COMMERCIAL INVOICE
NO. 01 / 01-S / VC / 01 / 23

QUANTITY	DESCRIPTION	UNIT PRICE US \$	TOTAL US \$
6 U	Reagen	5.00	30.00
Value for custom purpose only			30.00

Country of Origin : Indonesia

Note :
- These samples have no Commercial value and are sent free of charge/without payment.
- The cost in this invoice is indicated only for customs purposes and for determining the customs value

E & O E
Jakarta, 20 January 2023
PT. Vaksindo Satwa Nusantara
vaksindo
Refiana Lestary
Supervisor Biotech

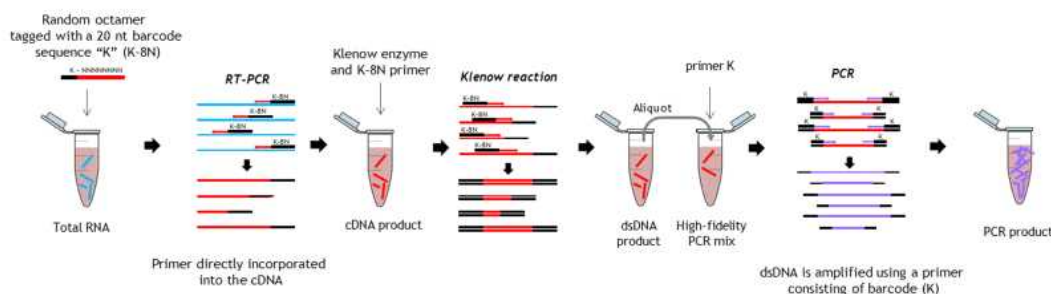
<그림. JAPFA Comfeed로부터의 샘플 수입을 위한 통관 서류>

<표. 인도네시아 유래 QX형 IBV 정보>

Isolate ID	Collection date	Chicken type	Geographic location
ID716	2021-06-06	Broiler breeder	Pangandaran, West Java
ID730	2021-08-07	Layer	Nganjuk, West Java
ID757	2021-11-10	Broiler breeder	Pasuruan, East Java
ID761	2021-12-01	Broiler breeder	Purwakarta, West Java
ID833	2022-03-08	Broiler breeder	Serang, West Java
ID865	2022-06-03	Layer	Padang, West Sumatra

- 인도네시아의 유행 중인 바이러스 정보 확보를 위해 인도네시아 축산기업인 JAFPA Comfeed와 협력하여 West Java, East Java 및 West Sumatra의 전염성 기관지염 바이러스 6가지를 분석함. NGS 분석을 위해 시료의 필터처리, DNase I 처리 및 RNA 증폭을 위해 SISPA를 이용함.

Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA)



<그림. NGS 분석을 위한 single random primer 기반 RNA 유전체 증폭방법: SISPA>

<표. 인도네시아 유래 IBV 6개의 sequencing 및 assembly 결과>

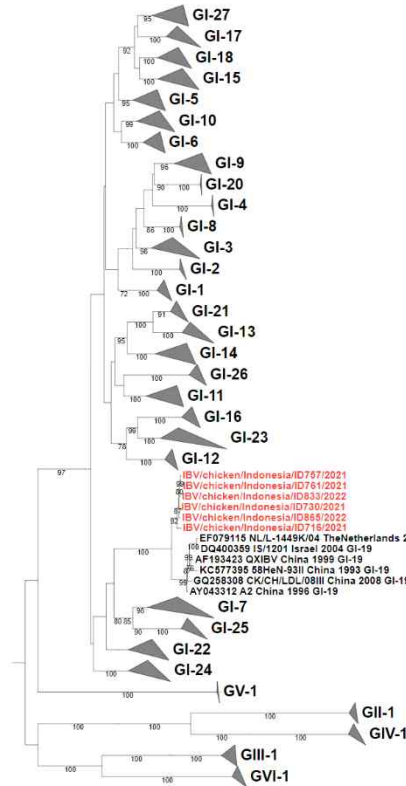
Isolates	Real-time PCR (Ct value)	Total NGS reads	Trimmed reads (>Q20)	Genome assembly results	
				R1	Number of assembled reads
ID716	14.96	113,830	113,452 109,829		156,881
ID730	15.07	111,554	110,699 107,578		166,556
ID757	11.11	107,493	107,145 104,339		171,127
ID761	17.40	103,461	102,746 99,328		182,995
ID833	15.96	101,121	100,794 97,789		184,805
ID865	14.80	106,075	105,824 102,990		200,258

- NCBI genebank database의 199개의 시퀀스와 NGS를 통해 확보한 전장유전체 중 S1 유전자를 이용해 ML tree 분석 결과 6개의 IBV 모두 QX형으로 확인됨. 또한, NCBI BLAST 결과 말레이시아, 태국, 중국 및 한국 등 주변국과의 유사도가 높음을 확인함.
- NCBI genebank database 중 이번 6개와 가장 유사도가 높은 39개의 시퀀스로 Bayesian 계통지리학 time to most recent common ancestor 분석 결과 6가지의 IBV는 2014년 5월 27일에서 2018년 9월 3일 사이에 들어왔을 가능성이 높으며, 가장 유사도가 높은 말레이시아 IBV/IBS142/2015에서 유래되었다면 2001년 9월 16일에서 2008년 9월

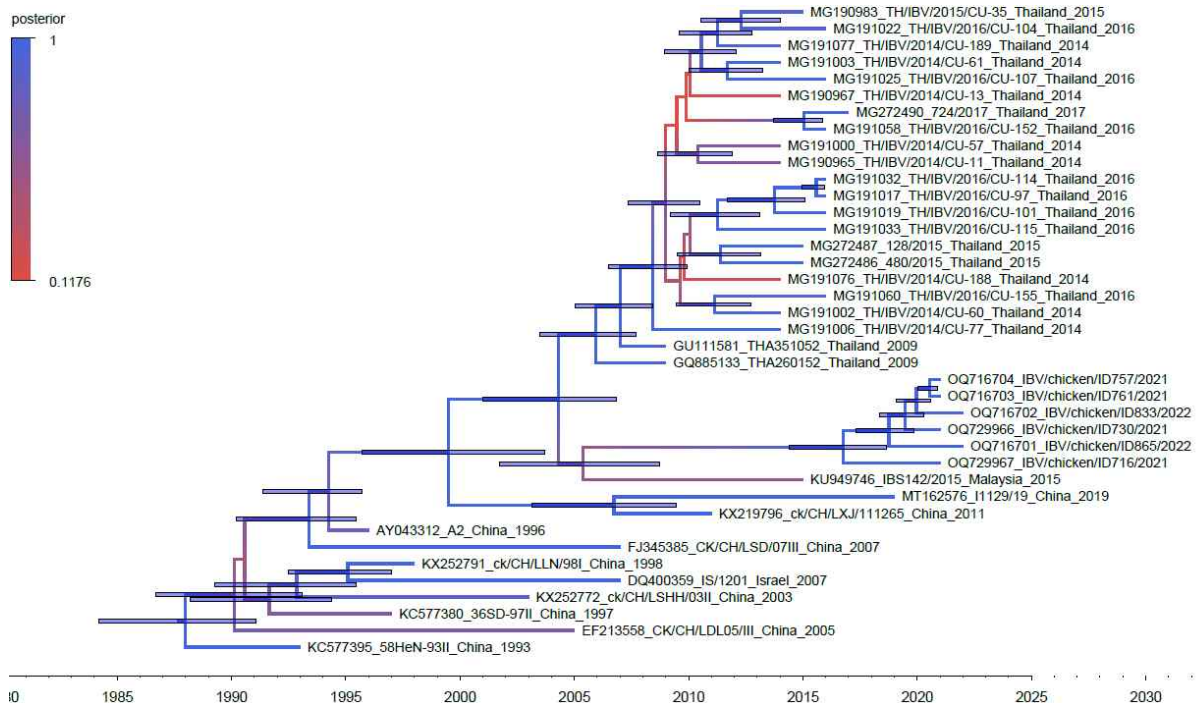
28일 사이에 유입되었을 가능성이 높음을 확인함.

- 중국에서 동남아를 거쳐 호주까지 연결되어있는 지리학적 특성을 지닌 인도네시아의 바이러스를 지속적으로 모니터링하여 바이러스의 전파 양상을 관찰할 필요가 있음.

Tree scale: 0.1



<그림. 인도네시아 유래 QX형 IBV S1 유전자를 이용한 ML tree 결과>



<그림. Bayesian 계통수 분석법을 사용한 인도네시아 유래 QX형 IBV 계통수>

d) 캄보디아

Material Transfer Agreement

Parties

(Recipient)

Professor Dong-Hun Lee
Konkuk University
Neungdong-ro 120, Gwangjin-gu, 05029 Seoul, Korea
donghunlee@konkuk.ac.kr

(Provider)

Dr. Sothya Tum
National Animal Health and Production Research Institute
Sola Street (371), Phnom Penh 120603, Cambodia
sothyatum@gmail.com

This Material Transfer Agreement (hereinafter referred to as "MTA") is entered into between National Animal Health and Production Research Institute of Cambodia (hereinafter referred to as the "Provider") and Konkuk University (hereinafter referred to as the "Recipient"), collectively referred to as the "Parties."

Background

- 1.1 The Provider is National Animal Health and Production Research Institute of Cambodia.
1.2 The Recipient is Konkuk University.
1.3 The Parties wish to engage in a research collaboration project focused on "Whole genome sequencing of African Swine Fever genome", hereinafter referred to as the "Project."

Materials

- 2.1 The Provider agrees to provide the following materials to the Recipient:
- African Swine Fever Virus (ASFV) DNA samples (hereinafter referred to as the "Materials").
- one hundred and forty-three (143) ASFV DNA samples information available in the attached file: sampleinfo.xlsx
2.2 The Provider represents that it has legal ownership or rights to distribute the Materials and that the Materials are suitable for the purpose of the Project.

Use of Materials

- 3.1 The Recipient agrees to use the Materials solely for the purpose of conducting the Project.
3.2 The Recipient shall not use the Materials for any commercial or for-profit purposes without obtaining prior written consent from the Provider.
3.3 The Recipient shall not transfer the Materials to any third party without obtaining prior written consent from the Provider.

Intellectual Property Rights

- 4.1 The Provider retains all intellectual property rights in the Materials.
4.2 Any inventions, discoveries, or intellectual property resulting from the use of the Materials during the course of the Project shall be jointly owned by the Parties, subject to the negotiation of a separate agreement governing intellectual property rights.

Confidentiality

- 5.1 The Recipient agrees to treat all information related to the Materials as confidential and shall not disclose or

use such information for any purposes other than those related to the Project without obtaining prior written consent from the Provider.

- 5.2 The obligations of confidentiality under this MTA shall survive for a period of five (5) years from the termination or completion of the Project.

Disclaimer of Warranty

6.1 The Provider makes no representations or warranties, either expressed or implied, regarding the Materials, including but not limited to their merchantability or fitness for a particular purpose.

Indemnification

7.1 The Recipient agrees to indemnify, defend, and hold the Provider harmless from and against any claims, damages, liabilities, and expenses arising out of or in connection with the use of the Materials by the Recipient or any breach of this MTA.

Term and Termination

- 8.1 This MTA shall commence on the effective date of the last signatory below and shall continue until the completion of the Project, unless terminated earlier by mutual agreement of the Parties.
8.2 Either Party may terminate this MTA for any reason by providing written notice to the other Party at least thirty (30) days prior to the intended date of termination.

Governing Law and Jurisdiction

- 9.1 This MTA shall be governed by and construed in accordance with the laws of Republic of Korea.
9.2 Any disputes arising out of or in connection with this MTA shall be subject to the exclusive jurisdiction of the courts of Republic of Korea.

Signed for the Provider
by its authorised representative:

Signed for the Recipient
by its authorised representative:

Signature

Signature

Dr Sothya Tum

Prof. Dong-Hun Lee

Print Name

Print Name

Date:

Date: 2023-6-9

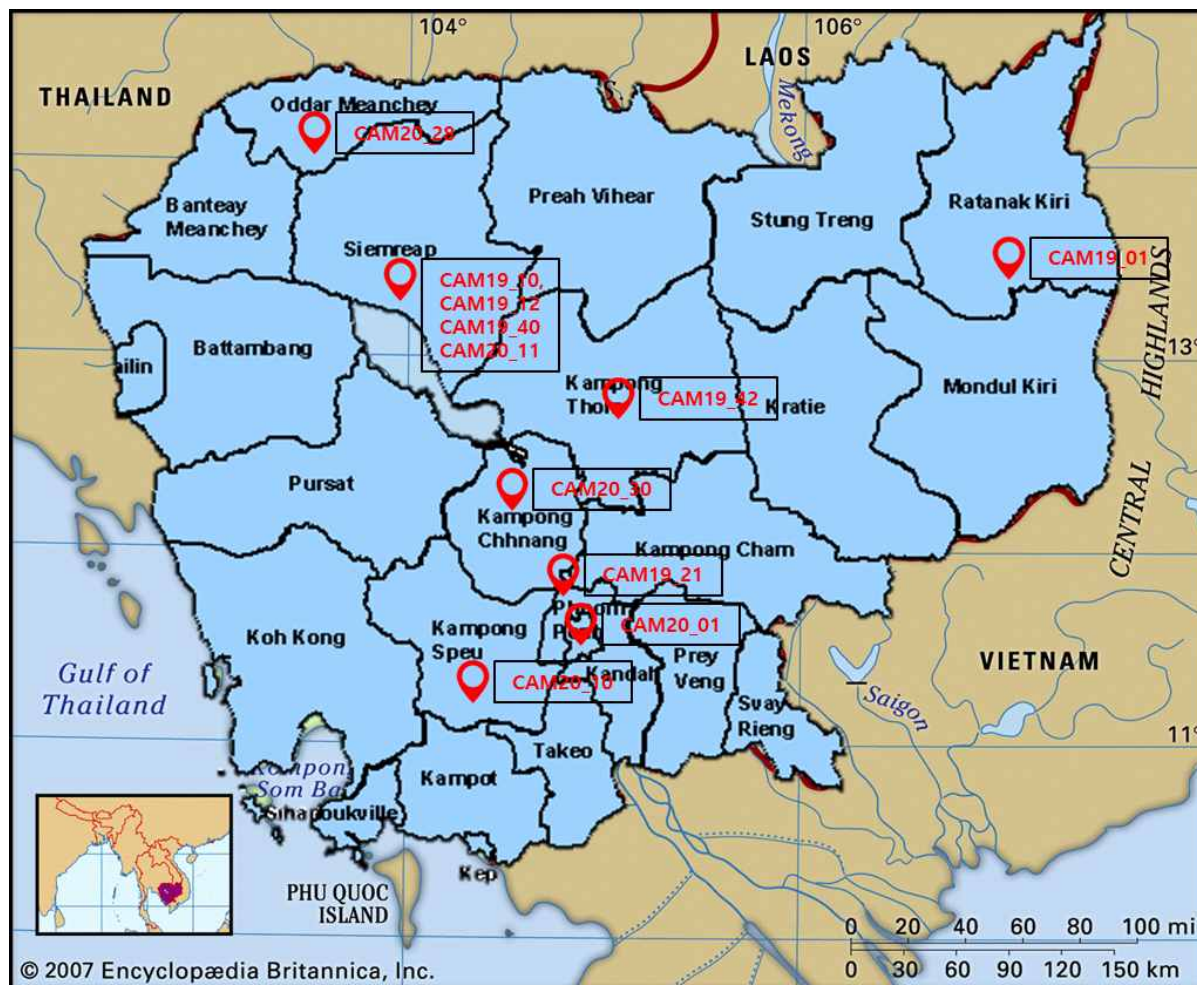
<그림. 캄보디아 ASFV 의심 시료 MTA 서류>

- 미국 코네티컷 대학의 Guillermo Risatti 교수의 네트워크를 이용하여, 캄보디아 Sorthya Tum 박사와 함께 캄보디아에 유행 중인 ASFV 유전체 시료를 확보함. ASFV 유전자 30건 이상을 확보하였으며, MTA(material transfer agreement) 작성 후 DNA/유전물질 형태로 수입을 완료함.
- 2019년~2020년 캄보디아에서 발생한 ASFV 의심 시료를 불활성화된 상태로 제공받아서 진행함. 해당 시료들의 유전자 양과 genotype을 확인하여 모든 시료가 genotype II에 속하는 것을 확인 후 11개의 시료를 선별하여 Probe-Capture Illumina Sequencing을 진행함. ASFV 의심 시료의 분리 시기, 분리 위치, ASFV real-time PCR Ct 수치는 아래 <표 >와 같음.

<표. '19년~'20년 캄보디아에서 발생한 ASFV 의심 시료의 분리 시기, 분리 위치, ASFV real-time PCR Ct 수치>

Sample Name	Date collected	Sample type	Source	Contiguous Country (or location)	Ct
CAM19_1	27-Mar-19	Serum	Somkaninh Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	18.0
CAM19_2	27-Mar-19	Serum	Somkaninh Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	22.0
CAM19_3	27-Mar-19	Serum	Somkaninh Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	22.2
CAM19_4	31-Mar-19	Serum	Somtrak Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	22.0
CAM19_5	31-Mar-19	Serum	Somtrak Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	22.4
CAM19_6	31-Mar-19	Flea	Somtrak Village,Somthom Commune,Oyadav District,Rattanakiri Province	Vietnam	33.7
CAM19_7	5-Apr-19	Serum	Kam Village,laak Commune,Ochum District,Rattanakiri Province	Laos & Vietnam	22.4
CAM19_8	5-Apr-19	Serum	Kam Village,laak Commune,Ochum District,Rattanakiri Province	Laos & Vietnam	22.5
CAM19_9	5-Apr-19	salt meat	Kam Village,laak Commune,Ochum District,Rattanakiri Province	Laos & Vietnam	26.5
CAM19_10	26-Jun-19	Serum	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	20.3
CAM19_11	26-Jun-19	salt meat	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	19.7
CAM19_12	1-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	19.0
CAM19_13	1-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	19.4
CAM19_14	3-Jul-19	Serum	kaokty Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	24.3
CAM19_15	3-Jul-19	Serum	kaokty Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	24.2
CAM19_16	3-Jul-19	Serum	Chak Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	23.7
CAM19_17	27-Jul-19	Serum	Russey chur khangtbaung Village,Kraolko Commune,Svaychrum District,SvayRieng Province	Vietnam & middle	34.9
CAM19_18	27-Jul-19	Serum	Russey chur khangtbaung Village,Kraolko Commune,Svaychrum District,SvayRieng Province	Vietnam & middle	29.9
CAM19_19	2-Jul-19	Serum	Ampil Village,Ponley Commune,Angkorborey District,Takoe Province	Vietnam	23.4
CAM19_20	2-Jul-19	Serum	Ampil Village,Ponley Commune,Angkorborey District,Takoe Province	Vietnam	23.5
CAM19_21	4-Jul-19	Serum	Chak Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	23.7
CAM19_22	4-Jul-19	Serum	Chak Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	24.0
CAM19_23	4-Jul-19	Serum	kaokty Village,Chak Commune,O Reangov District,Tbongkhum Province	Vietnam	24.5
CAM19_24	4-Jul-19	Serum	Kampong Chamlang Village, Kampong Chamlang Commune,Khsach Kandal District,Kandal Province	Vietnam & middle	27.4
CAM19_25	8-Jul-19	Serum	Ang Village, Krang Yov Commune,Sang District,Kandal Province	Vietnam & middle	22.6
CAM19_26	18-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of, Kampong Thom Province	middle of Cambodia	26.9
CAM19_27	18-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of, Kampong Thom Province	middle of Cambodia	21.3
CAM19_28	18-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of, Kampong Thom Province	middle of Cambodia	27.4
CAM19_29	21-Jul-19	Serum	Toul tnot Village, Kokir Commune,Kien Svay District,Kandal Province	Vietnam & middle	32.5
CAM19_30	25-Jul-19	meat	Toul tnot Village, Kokir Commune,Kien Svay District,Kandal Province	Vietnam & middle	29.8
CAM19_31	25-Jul-19	meat	Toul Sala Village, Sang Phnum Commune,Sang District,Kandal Province	Vietnam & middle	27.0
CAM19_32	25-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam & middle	26.9
CAM19_33	26-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of KampongCham Province	middle of Cambodia	25.1
CAM19_34	27-Jul-19	meat	Slaughterhouse of KampongCham Province	middle of Cambodia	24.8
CAM19_35	30-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Kandal Province	Vietnam	27.1
CAM19_36	31-Jul-19	meat	Slaughterhouse of KampongCham Province	middle of Cambodia	27.2
CAM19_37	31-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Kandal Province	Vietnam	26.9
CAM19_38	31-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam	24.2
CAM19_39	31-Jul-19	Serum	Slaughterhouse of Koh Kong Province	Thailand	18.1
CAM19_40	6-Aug-19	meat	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand	19.7
CAM19_41	15-Aug-19	Serum	Slaughterhouse of Kampong Thom Province	middle of Cambodia	17.6
CAM19_42	15-Aug-19	Serum	Slaughterhouse of Kampong Thom Province	middle of Cambodia	17.1
CAM19_43	15-Aug-19	Serum	Slaughterhouse of Kampong Thom Province	middle of Cambodia	19.0
CAM19_44	22-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & Thailand	21.9
CAM19_45	22-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & Thailand	20.9
CAM19_46	22-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & Thailand	22.5
CAM19_47	22-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & Thailand	27.9
CAM19_48	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.9
CAM19_49	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.4
CAM19_50	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	20.0
CAM19_51	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	19.0
CAM20_1	8-Apr-20	blood	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam & middle	14.5
CAM20_2	8-Apr-20	blood	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam & middle	16.3
CAM20_3	8-Apr-20	blood	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam & middle	14.7
CAM20_4	9-Apr-20	blood	Slaughterhouse of Phnom Penh	Vietnam & middle	21.6
CAM20_5	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	17.5
CAM20_6	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	26.2
CAM20_7	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	1.1
CAM20_8	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	18.5
CAM20_9	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	23.1
CAM20_10	28-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	4.5
CAM20_11	29-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	15.1
CAM20_12	29-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	26.6
CAM20_13	29-Sep-20	blood	Slaughterhouse of Siem Reap Province	Thailand & middle	21.0
CAM20_14	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	18.0
CAM20_15	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	14.7
CAM20_16	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	17.5
CAM20_17	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	17.0
CAM20_18	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	17.4
CAM20_19	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	24.5
CAM20_20	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	18.0
CAM20_21	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	16.0
CAM20_22	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	16.6
CAM20_23	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	1.5
CAM20_24	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	18.6
CAM20_25	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	17.7
CAM20_26	24-Oct-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Speu Province	Vietnam & middle	19.1
CAM20_27	9-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Oddar meanChey Province	Thailand	Undetected
CAM20_28	9-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Oddar meanChey Province	Thailand	7.8
CAM20_29	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	Undetected
CAM20_30	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	5.8
CAM20_31	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.9
CAM20_32	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.1
CAM20_33	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	15.7
CAM20_34	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	15.2
CAM20_35	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.1
CAM20_36	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	14.8
CAM20_37	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	18.5
CAM20_38	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	15.3
CAM20_39	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	17.1
CAM20_40	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	19.8
CAM20_41	19-Nov-20	blood	Slaughterhouse of Kampong Chhnang Province	middle of Cambodia	17.4

- 이 중 Ct value, 발생 시기, 발생 위치를 고려하여 CAM19_01, CAM19-10, CAM19-12, CAM19-21, CAM19-40, CAM19-42, CAM20-01, CAM20-10, CAM20-11, CAM20-28, CAM20-30을 선별하여 Illumina Sequencing을 진행함. Illuminae Sequencing을 진행한 시료들의 발생 위치를 표기한 정보는 아래 <그림>과 같음.

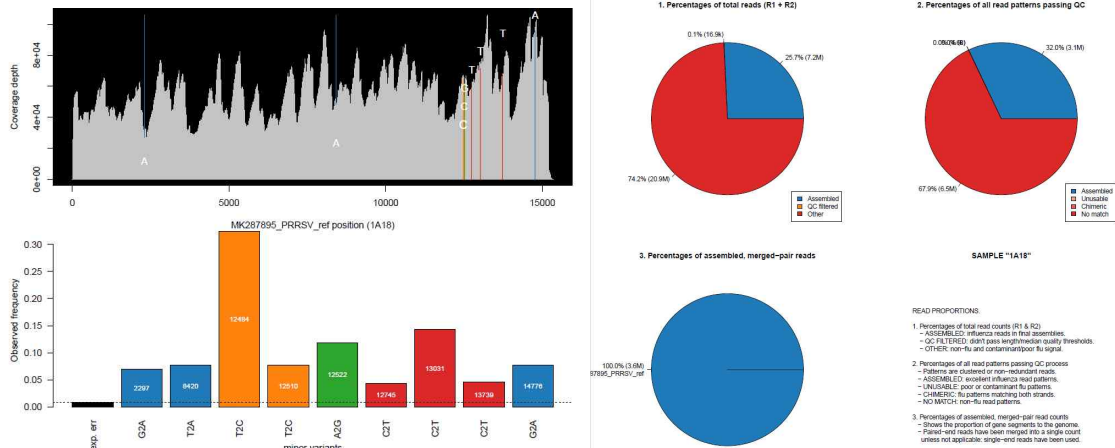


<그림. Illuminae Sequencing을 진행한 시료들의 발생 위치를 표기한 정보>

- 미국 코네티컷 대학 연구팀에서 사용 중인 NGS 분석 프로그램, 기기사용법 등을 활용하여 본 연구에 적용하였으며, ASFV 분석에 대한 최적화된 방법을 본 연구결과에 제시함.

e) 인도

- 미국 코네티컷 대학의 Guillermo Risatti 교수의 네트워크를 이용하여, 인도 중앙 농업 대학교 수의병리학 연구실과 공동연구를 통해 고병원성 PRRSV(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus) 유전자 시료 5건을 공유받아 HP PRRSV NGS DATA 자동화 분석 파이프라인 개발 및 성능 시험함.



<그림. 고병원성 PRRSV의 시료 NGS data 분석 결과>

- 세계적으로 양 염소 등에서 큰 문제가 되고 있는 Peste des petits ruminants (PPR) 3건을 카자흐스탄 국가연구기관으로 부터 의뢰받아 전장유전체 분석을 실시 중.

g) 잠비아

- 미국 코네티컷 대학의 Guillermo Risatti 교수의 네트워크를 이용하여, 아프리카 잠비아의 Herman Chambaro 박사와 함께 잠비아에 유행 중인 ASFV에 분석에 대한 기술을 지원하고 유전체를 공동 분석함.
- 잠비아에서 수집한 진드기 및 돼지유래 샘플들을 냉동고에 저장하고 유전체를 추출하여 ASF를 진단하고 Genotype을 분석하여 정보를 공유함.
- 세계적으로 유행하고 있는 Genotype II 형 이외에 다양한 타입의 ASF가 아프리카에 유행중인 것을 확인하였고, 추후 다른 타입의 바이러스가 아프리카 이외 지역에 유행할 경우 자원을 활용할 수 있도록 잠비아와 연구 네트워크를 구성함.

No	Sample type	Collection date	Archived sample	Origin	Province	Geno type
1	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
2	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
3	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
4	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
5	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
6	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
7	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
8	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
9	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
10	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
11	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
12	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I

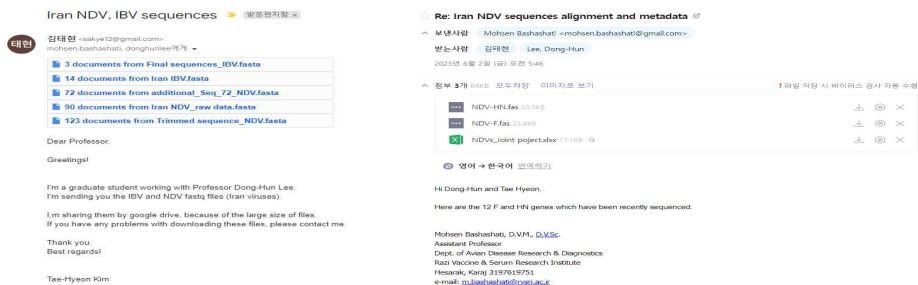
13	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
14	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
15	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
16	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
17	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
18	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
19	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
20	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
21	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
22	0. moubatatick DNA	May 2019	0. moubatatick homogenate	Mosi-oa-Tunya National Park	Southern	I
23	0. moubatatick DNA	November 2019	0. moubatatick homogenate	South Luangwa National Park	Southern	XII
24	0. moubatatick DNA	November 2019	0. moubatatick homogenate	Kafue National National Park	Southern	XIV
25	Pig DNA	2014	Tissue homogenate	Mbala District	Northern	II
26	Pig DNA	2017	Tissue homogenate	Chipata District	Eastern	II
27	Pig DNA	2014	Tissue homogenate	Chipata District	Eastern	II
28	Pig DNA	2014	Tissue homogenate	Kalomo District	Southern	XIV
29	Pig DNA	2013	Tissue homogenate	Kasempa District	North-Western	XIV
30	Pig DNA	2013	Tissue homogenate	Kazungula District	Southern	I
31	Pig DNA	2013	Tissue homogenate	Choma District	Southern	I
32	Pig DNA	2013	Tissue homogenate	Lusaka District	Lusaka	I
33	Pig DNA	2015	Tissue homogenate	Kitwe District	Copperbelt	I
34	Pig DNA	2015	Tissue homogenate	Lusaka District	Lusaka	I
35	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Lunagwa District	Lusaka	II
36	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Katete District	Eastern	II
37	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Mbala District	Northern	II
38	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Solwezi District	North-Western	XIV
39	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Kabompo District	North-Western	XIV
40	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Nakonde District	Northern	II
41	Pig DNA	2021	Tissue homogenate	Mwansabombwe District	Luapula	??
42	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Chilanga District	Lusaka	I
43	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Kafue District	Lusaka	I
44	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Nyimba District	Eastern	??
45	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Petauke District	Eastern	??
46	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Livingstone District	Southern	??
47	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Mwandi District	Western	??

47	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Chingola Dostrict	Eastern	??
47	Pig DNA	2022	Tissue homogenate	Mwansabombwe District	Luapula	??

- 잠비아와 같은 개발도상국에서 활용이 가능한 PCR 기법을 확립함. Basto, A. P., Portugal, R. S., Nix, R. J., Cartaxeiro, C., Boinas, F., Dixon, L. K., ... & Martins, C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in Ornithodoros erraticus. Archives of virology, 151(4), 819-826 논문에 발표된 Nested PCR기법을 활용하여 진드기 및 돼지 샘플에서 바이러스 진단을 실시한 결과, 실험장비가 부족한 국가에서 활용이 가능할 것으로 판단됨.

Lane	Primers	Expected Size (bp)	Gel image
1	PPA1/PPA2	257	
2	CVR1/CVR2	Variable	
3	P72U/P72D	478	
4	PPA89/PPA722	676	

h) 이란



<그림. 이란 협력 연구진 Mohsen Bashashati 교수와 주고 받은 이메일>

- 이란 Razi Vaccine & Serum Research Institute의 Mohsen Bashashati 교수를 통해 이란 가금농장 및 야생조류로부터 분리한 뉴캐슬병 바이러스 총 88개의 유전체를 수령하여 NGS 분석을 실시함.

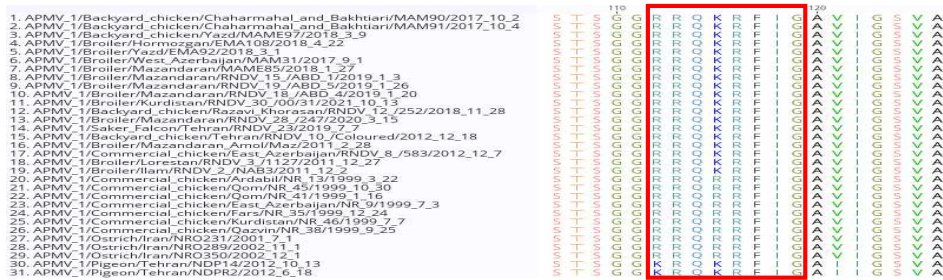
<표. 이란 가금류 및 야생조류 분리 병원체 목록>

#	Isolate name	Host	Location	Collection date
1	NR-2	Commercial chicken	East Azerbaijan	06-May-99
2	NR-3	Commercial chicken	East Azerbaijan	09-Jun-99
3	NR-4	Commercial chicken	East Azerbaijan	10-Apr-99
4	NR-5	Commercial chicken	East Azerbaijan	15-May-99
5	NR-6	Commercial chicken	East Azerbaijan	05-May-99
6	NR-9	Commercial chicken	East Azerbaijan	03-Jul-99
7	NR-11	Commercial chicken	East Azerbaijan	14-Aug-99
8	NR-12	Commercial chicken	West Azerbaijan	15-Feb-00
9	NR-13	Commercial chicken	Ardabil	22-Mar-99
10	NR-14	Commercial chicken	Isfahan	21-Jan-99
11	NR-15	Commercial chicken	Isfahan	22-Feb-99

12	NR-16	Commercial chicken	Isfahan	25-Feb-99
13	NR-17	Commercial chicken	Isfahan	08-Mar-99
14	NR-18	Commercial chicken	Isfahan	02-May-99
15	NR-19	Commercial chicken	Tehran	16-Feb-00
16	MAME85		Mazandaran	27-Jan-18
17	NR-31	Commercial chicken	Razavi Khorasan	08-Jan-00
18	NR-32	Commercial chicken	Razavi Khorasan	11-Jan-00
19	NR-35	Commercial chicken	Fars	24-Dec-99
20	NR-36	Commercial chicken	Qazvin	20-Jul-99
21	NR-37	Commercial chicken	Qazvin	23-Sep-99
22	NR-38	Commercial chicken	Qazvin	25-Sep-99
23	MAM90	Backyard chicken	Chaharmahal and Bakhtiari	02-Oct-17
24	MAM91	Backyard chicken	Chaharmahal and Bakhtiari	04-Oct-17
25	NR-41	Commercial chicken	Qom	16-Jan-99
26	NR-42	Commercial chicken	Qom	19-Jan-99
27	NR-43	Commercial chicken	Qom	07-Dec-99
28	NR-45	Commercial chicken	Qom	30-Oct-99
29	NR-46	Commercial chicken	Kurdistan	07-Jul-99
30	NR-47	Commercial chicken	Kerman	26-Feb-00
31	NRO231	Ostrich	Iran	01-Jul-01
32	EMA92	Broiler	Yazd	01-Mar-18
33	NRO289	Ostrich	Iran	01-Nov-02
34	NRO350	Ostrich	Iran	01-Dec-02
35	NDPR2	Pigeon	Tehran	18-Jun-12
36	NDP14	Pigeon	Tehran	13-Oct-12
37	NDP11	Pigeon	Tehran	15-Aug-12
38	NDP17	Pigeon	Tehran	20-Oct-12
39	NDP19	Pigeon	Tehran	04-Jul-12
40	NDP20	Pigeon	Tehran	13-Nov-12
41	NDP21	Pigeon	Tehran	21-Nov-12
42	NDP22	Pigeon	Tehran	28-Nov-12
43	NDP25	Pigeon	Tehran	11-Dec-12
44	NDP27	Pigeon	Tehran	03-Dec-12
45	NDP61	Pigeon	Tehran	25-Apr-13
46	NDP79	Pigeon	Tehran	19-Sep-13
47	NDP92	Pigeon	Tehran	16-Sep-13
48	NDP95	Pigeon	Tehran	07-Sep-13
49	RNDV-1 (NAB1)	Broiler breeder	Tehran	22-Nov-09
50	RNDV-2 (NAB3)	Broiler	Ilam	02-Dec-11
51	RNDV-3 (1127)	Broiler	Lorestan	27-Dec-11
52	RNDV-4 (1104)	Pigeon	Tehran	04-Jan-12
53	RNDV-5 (86)	Partridge	Tehran	03-May-12
54	RNDV-6	Rose-ringed Parakeet	Tehran	04-Jul-12
55	RNDV-7 (PNDV)	Pigeon	Alborz	04-Aug-12
56	RNDV-8 (583)	Commercial chicken	East Azerbaijan	07-Dec-12
57	RNDV-9 (584)	Commercial chicken	West Azerbaijan	09-Dec-12
58	RNDV-10 (Coloured)	Backyard chicken	Tehran	18-Dec-12
59	RNDV-11 (922)-Kordan	Pigeon	Alborz	09-May-13
60	RNDV-12 (252)	Backyard chicken	Razavi Khorasan	28-Nov-18
61	RNDV-13 (253)	Backyard chicken	Razavi Khorasan	29-Nov-18
62	RNDV-14 (19-249)	Broiler	Yazd	15-Dec-18
63	RNDV-15 (ABD-1)	Broiler	Mazandaran	03-Jan-19
64	RNDV-16 (ABD-2)	Broiler	Mazandaran	06-Jan-19
65	RNDV-17 (ABD-3)	Broiler	Mazandaran	07-Jan-19
66	RNDV-18 (ABD-4)	Broiler	Mazandaran	20-Jan-19
67	RNDV-19 (ABD-5)	Broiler	Mazandaran	26-Jan-19
68	RNDV-20 (175)	Hooded crow	Tehran	30-Mar-19
69	RNDV-21 (CB)	Cockatiel	Alborz	05-May-19
70	RNDV-22 (122)	Peafowl	Tehran	05-Jun-19
71	RNDV-23	Saker Falcon	Tehran	07-Jul-19
72	RNDV-24 (186)	Quail	Tehran	10-Jul-19
73	RNDV-25 (231)	Broiler	Mazandaran	17-Apr-19
74	RNDV-26 (238)	Turkey	Razavi Khorasan	31-Jul-19

75	RNDV-27 (246)	Broiler	Mazandaran	25-Feb-20
76	RNDV-28 (247)	Broiler	Mazandaran	15-Mar-20
77	MAME97	Backyard chicken	Yazd	09-Mar-18
78	MAM105	Pigeon	Kermanshah	03-Mar-18
79	RNDV-29 (266)	Broiler	Kordestan	28-Jul-21
80	MAM18	Broiler	West Azerbaijan	01-Jul-17
81	MAM19	Broiler	West Azerbaijan	01-Oct-17
82	MAM31	Broiler	West Azerbaijan	01-Sep-17
83	MAM68	Broiler	Isfahan	01-Dec-17
84	MAM72	Broiler	Isfahan	01-Jan-18
85	MAM81	Broiler	Boushehr	01-Feb-18
86	Maz	Broiler	Mazandaran-Amol	28-Feb-11
87	EMA108	Broiler	Hormozgan	22-Apr-18
88	RNDV-30 (00/31)	Broiler	Kurdistan	13-Oct-21

- 1950년대 초 이란에서 genotype VII NDV가 처음 발견된 이후로, 이 바이러스는 꾸준한 발생을 보여왔음.
- 이란 내 genotype VII NDV의 진화를 보다 자세히 이해하기 위해, Mohsen Bashashati 교수와 그의 연구팀은 바이러스 RNA유전체 NGS raw data를 확보하였고, 건국대학교 연구팀이 계통학적 분석을 진행하였음.
- 제공받은 data 중, 이란에서 유행중인 genotype VII로 분류되는 31개의 바이러스를 선택하여 분석하였고, 이러한 바이러스들의 F gene cleavage site를 조사한 결과, ¹¹¹GRRQKR-FIG¹¹⁹, ¹¹¹GKRQKR-FIG¹¹⁹ 과 같은 multi-basic amino acid motif를 발견하였음. 이는 이러한 바이러스들이 mesogenic 또는 velogenic strain으로 분류될 것으로 예상되며, 이는 이란에서 genotype NDV VII의 변이와 병원성에 대한 정보로 활용될 수 있음.
- 이 바이러스들에 대한 F gene과 HN gene의 계통학적 분석을 수행한 결과, 이스라엘과 이라크에서 이란으로 바이러스가 전파된 후, 해당 지역에서 계속해서 유행하며 진화하고 있음을 확인할 수 있음.



<그림. Iran에서 분리된 NDV의 fusion(F) protein cleavage site>



<그림. 이란에서 분리된 genotype VII NDV의 Maximum Clade Credibility (MCC) tree (이란에서 받은 바이러스는 빨간색으로 표시됨). (원) 이 바이러스들의 F gene과 HN gene의 Maximum Likelihood (ML) tree (● : 이란에서 받은 바이러스). (오)>

3) NGS 활용 신·변종 병원체 분석 기술 표준화

- 조류 코로나바이러스, 조류 인플루엔자 바이러스, 아프리카 돼지열병 바이러스

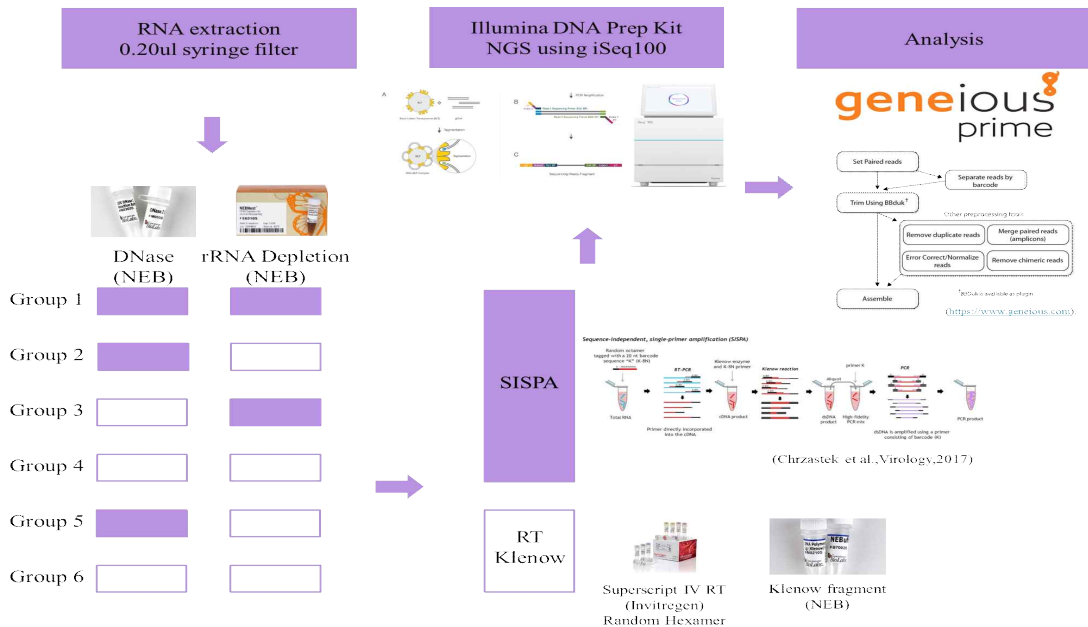
○ 조류코로나바이러스 NGS 분석 표준화

- 바이러스 NGS 분석을 위해 전처리 방법 표준화를 위한 연구를 수행함. 바이러스의 NGS 분석에서는 숙주의 세포 및 유전체를 제거하는 것이 가장 중요하며, 이에 따라 시료의 필터처리, DNase I 처리, Dialysis tube 처리, rRNA depletion kit, RNA 증폭 방법(SISPA: Sequence-independent, single-primer amplification) 등의 방법 등을 비교 분석함.

(1) 실험 내용

<1차 실험>

- 분석에는 재래시장에서 분리된 조류 코로나 바이러스(Infectious bronchitis virus) IBV/Chicken/Korea/21_C8CT/2021 균주를 사용함.
- 바이러스 필터 처리는 0.45 μ m 및 0.2 μ m의 pore크기를 가진 두가지의 필터를 비교하였음. 기존 0.2 μ m 필터 처리의 경우 바이러스의 역가가 낮아질 수 있다는 연구결과가 있었으나, real-time PCR에 기반한 바이러스 유전체 정량 실험 결과 0.2 μ m 필터 이용시 CT value가 약 1 정도 감소하는 것이 확인됨. 숙주 및 세균 유전체 제거가 더 중요하다고 판단되어 NGS 분석 시 0.2 μ m 필터를 기본적으로 적용함.
- DNase I 처리, rRNA depletion kit, SISPA 등은 아래 그림과 같이 실험을 구성하여 진행함.

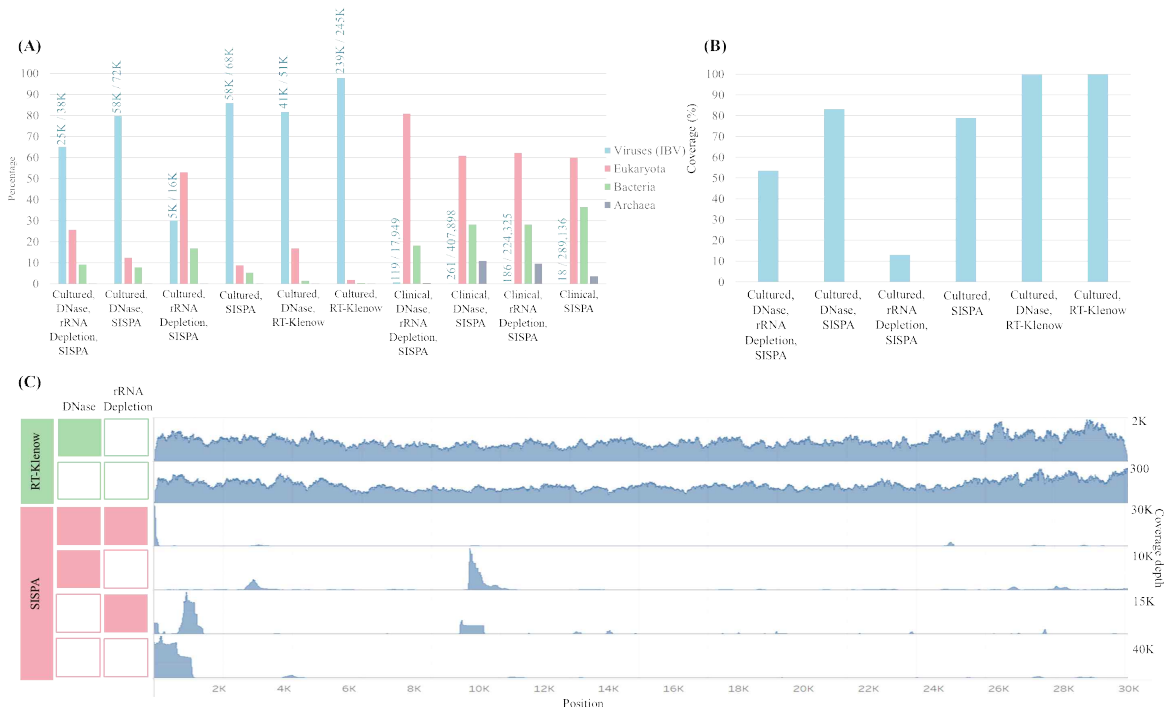


<NGS 전처리 조건 비교 실험 모식도>

(2) 실험 결과

- 실험 결과 SISPA를 통한 RNA 증폭 시 유전체가 고르게 증폭되지 않아 Reverse-transcription 및 Klenow enzyme을 이용한 방식에 비해 오히려 분석 결과가 좋지 않은 것이 확인됨.
- 또한, rRNA depletion kit의 경우 적용 시 오히려 NGS 결과가 더 안좋게 나오는 것이 확인됨. 현재 시판되는 rRNA depletion kit의 경우 사람, 마우스 및 랫 등에 초점이 맞추어져 있어, 본 연구에 사용한 조류 유래 시료의 경우 효과가 떨어지는 것으로 사료됨.
- 기대와 달리 DNase 적용 여부 또한 바이러스 NGS 분석 결과에 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인됨.

- 시험 결과 0.2 μ m 필터 처리를 진행한 시료의 경우 다른 전처리 방법 없이 Reverse-transcription 및 Klenow enzyme을 이용한 방식이 가장 효과적인 것으로 확인됨.
- 해당 방식은 바이러스의 종류에 제한 없이 모든 RNA 바이러스에 적용 가능한 방식으로 다양한 바이러스 분석에 적용 가능할 것으로 판단됨.



<바이러스 전처리 조건 별 NGS 결과 비교 결과: (A) NGS 결과의 taxonomy 분류를 통한 바이러스 및 숙주 유전체 비율 확인. (B) 20개 이상의 depth를 가지는 sequence를 기반으로 한 전장 유전체 coverage 확인 결과. (C) 각 조건 별 coverage depth 분포>

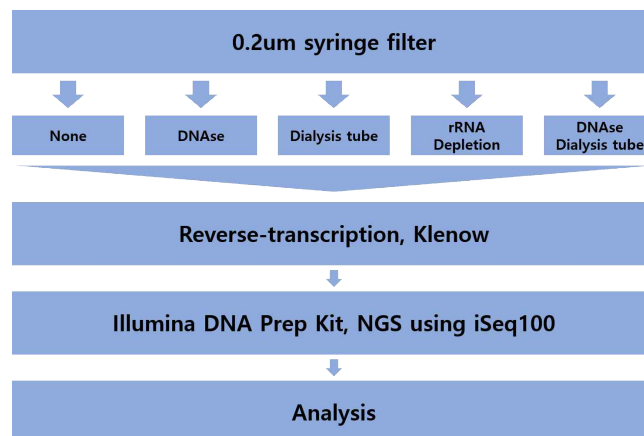
(3) 실험 결과 임상시료 적용

- 해당 분석 방법의 임상시료 적용 가능성 평가를 위해 바이러스 종란 배양액, 닭의 기관, 신장 및 Cecal tonsil 시료를 이용하여 기존에 확립한 NGS 분석기법 적용 가능성을 평가함.
- 저농도 시료에서의 적용 가능성을 평가하기 위해 각각 CT value 25 (약 10⁵EID₅₀/ml) 및 CT value 30(약 10³EID₅₀/ml)의 바이러스를 spiking 하여 평가를 진행함.
- 기존 결과와 마찬가지로 SISPA 적용 시에는 유전체 증폭이 일부분에 집중되어 전체 coverage가 낮아지는 것이 확인됨. RT-Klenow를 이용한 방법에서 더 높은 coverage가 확인됨.
- 기관 시료의 경우, CT value 30 시료 또한 전장 유전체 분석이 성공하였으나, 신장 및 Cecal tonsil 시료는 숙주 및 세균의 유전체 비율이 높아지며 전장 유전체 분석에는 실패함.
- 신장 및 Cecal tonsil 시료의 경우 depth 10 이상의 전장 유전체 분석은 실패하였으나, 전체적인 조류 코로나 바이러스의 유전체가 대부분 검출된 것이 확인됨.
- 모든 시료에서 SISPA를 적용하지 않은 RT-klenow 방식이 더 좋은 결과를 나타내었으며, 임상시료의 경우 일부 전장 유전체 확보는 어렵지만, 바이러스의 존재를 확인하는 metagenomic 연구 등에 활용 가능할 것으로 확인됨.



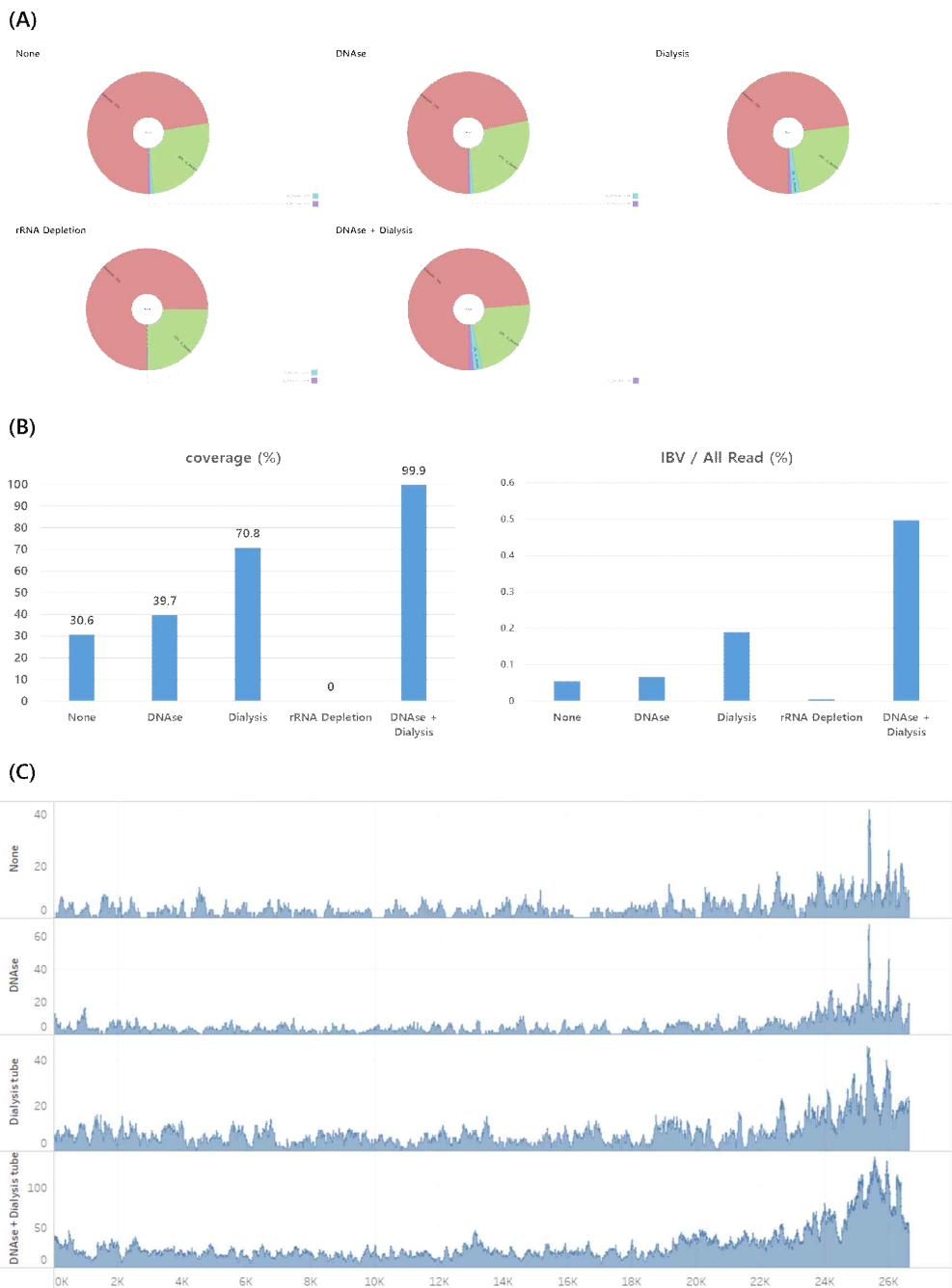
<임상시료 전처리 조건 별 NGS 결과 비교 결과: (A) NGS 결과의 taxonomy 분류를 통한 바이러스 및 숙주 유전체 비율 확인. (B) 10개 이상의 depth를 가지는 sequence를 기반으로 한 전장 유전체 coverage 확인 결과. (C) 각 조건 별 coverage depth 분포>

- 재래시장에서 분리된 CT value 25.3의 실제 임상시료인 조류 코로나 바이러스(Infectious bronchitis virus) IBV/Chicken/Korea/23_C10tra/2023 균주를 사용하여 실험을 추가적으로 진행함.
- DNase I 처리, Dialysis tube, rRNA depletion kit를 사용하여 실험을 진행하였으며, 1차 결과에서 SISPA를 통한 RNA 증폭 시 유전체가 고르게 증폭되지 않아 Reverse-transcription 및 Klenow enzyme을 이용한 방식만을 사용함.
- Dialysis tube를 사용한 시료는 PBS에 24시간 incubating 하였으며, incubating 이후 즉시 핵산을 추출한 후 Reverse-transcription 및 Klenow enzyme을 이용해 cDNA로 만들어 줌.



<임상시료 전처리 조건 비교 실험 모식도>

- coverage depth가 10이상을 가지는 위치만 coverage를 측정한 경우 전처리를 하지 않은 샘플은 30.6%가 cover되었고, DNase만 처리한 경우 39.7%가 cover되었으며, Dialysis tube를 처리한 경우 70.8%가 cover되었고, DNase와 Dialysis tube를 같이 처리한 경우 99.9%가 cover되어 전장유전체의 분석이 가능한 것으로 판단됨.
- 다만 rRNA Depletion을 진행한 경우 전처리를 하지 않은 샘플보다 낮은 coverage를 기록해 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단됨.
- 바이러스 이외의 세균이 많은 Cecal Tonsil에서의 전장유전체 확보는 어렵지만, DNase와 Dialysis tube를 활용하여 실제 기관 임상 시료에서 전장 유전체의 확보가 가능하며, 이는 바이러스의 존재를 확인하는 metagenomic 연구 뿐만 아니라 전장유전체 분석에도 활용 가능할 것으로 확인됨.



<임상시료 전처리 조건별 결과: (A) NGS 결과의 taxonomy 분류를 통한 바이러스 및 숙주 유전체 비율 확인. (B) 10개 이상의 depth를 가지는 sequence를 기반으로 한 전장 유전체 coverage 확인 결과. (C) 각 조건 별 coverage depth 분포>

○ 조류 인플루엔자 바이러스 NGS 분석 표준화

- 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 8개의 segmented RNA 유전체를 보유하고 있으나, 8개의 유전체 양 끝 공통된 염기서열을 가지고 있어 동시에 증폭이 가능하다. 이를 활용하여 기존 미국 USDA에서 확립한 조류 인플루엔자 바이러스 NGS 분석 방법을 (Chrastek et al., Virology, 2017) 본 연구팀의 iSeq100 및 miniSeq system에 적용함.

(1) 실험 내용

- 총 세 개의 primer (Optil-F1: GTTACGCGCCAGCAAAGCAGG; Optil-F2: GTTACGCGCCAGCGAAAGCAGG; Optil-R1: GTTACGCGCCAGTAGAAACAAGG)를 및 OneTaq® One-Step RT-PCR Kit를 이용하여 조류 인플루엔자 바이러스의 8개 유전체를 동시에 증폭시켰으며, PCR 프로그램은 아래와 같음.

Temperature	Time	cycle
55°C	2m	
42°C	60m	
94°C	2m	
94°C	30s	5X
44°C	30s	
68°C	3.5m	
94°C	30s	26X
57°C	30s	
68°C	3.5m	
68°C	10m	
10°C	∞	

<표. 조류인플루엔자 바이러스 유전체 증폭 PCR 온도 조건>

- 총 25건의 야생조류 분변 시료 유래 조류 인플루엔자 바이러스를 분석함.

(2) 실험결과

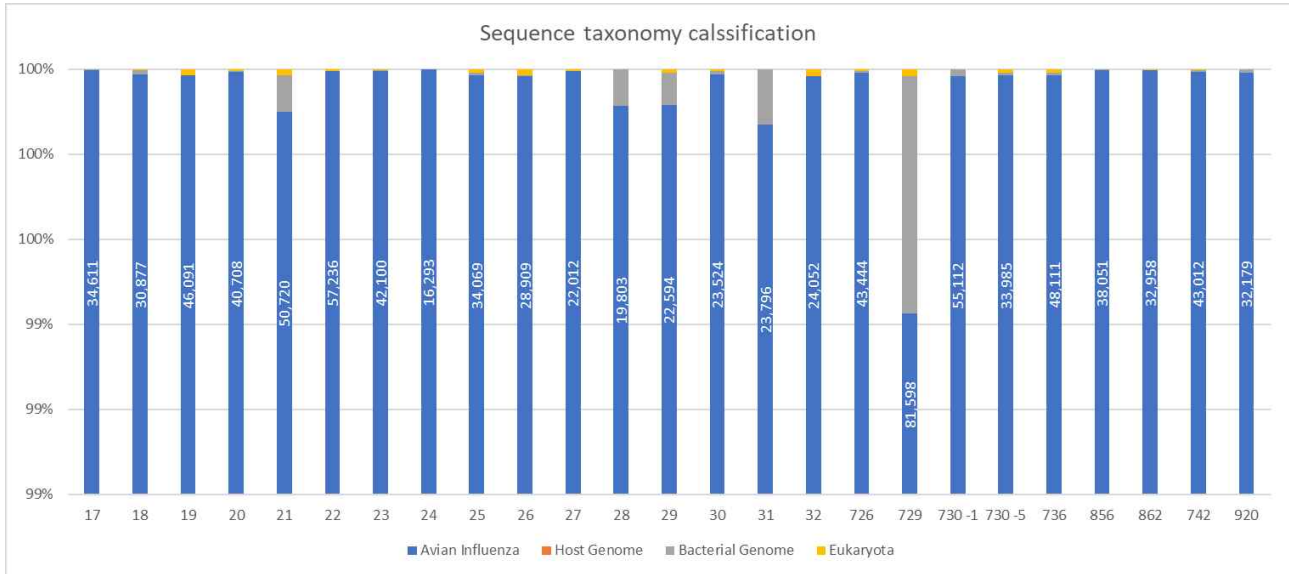
- 시험 결과 대부분의 시료에서 8개 segment 유전자가 모두 증폭이 되는 양상이 전기영동으로 확인됨.



<Opti primer를 이용한 조류 인플루엔자 증폭 실험 결과>

- 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 PCR 증폭을 통해 분석을 진행하였기에 숙주세포 및 세균의 유전체는 거의 검출되지 않는 것으로 확인됨. 초기 PCR 결과가 좋지 않았던 1개의 시료에서는 PCR에도 불구하고 세균의 유전체가 많이 검출됨.

- iseq100 system에 25개 시료를 분석한 결과 충분한 sequence 개수가 확보되는 것을 확인하였으며, 이후 최적화를 통해 더 많은 바이러스를 동시에 분석할 수 있을 것으로 사료됨.

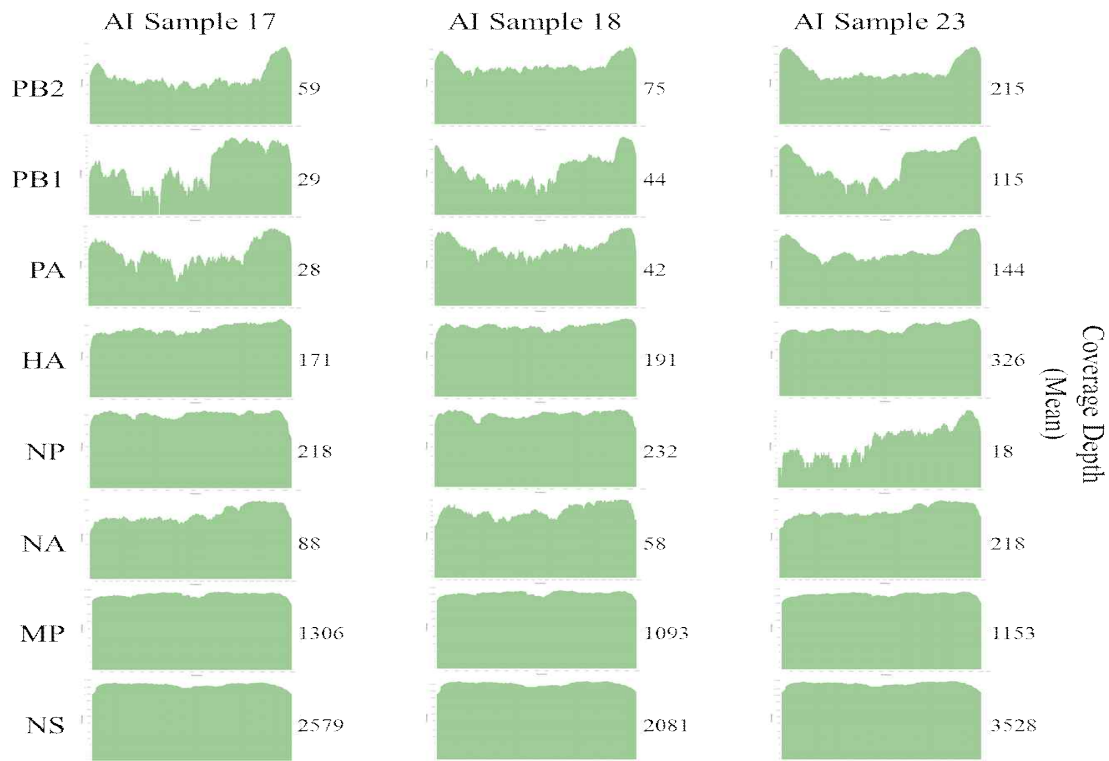


<조류인플루엔자 시료의 NGS 결과의 Taxonomy 분류 결과>

sample numb.	before Library Qubit (ng/uL)	After Library Qubit (ng/uL)	Trimming 전 총 Read 수	Trimming 후 총 Read 수
17	>50	4.37	146,908	52,466
18	36.8	3.94	141,584	47,596
19	>50	3.81	197,766	69,058
20	>50	4.28	194,544	67,364
21	>50	2.98	230,674	81,696
22	>50	3.32	249,612	84,938
23	>50	3.73	195,701	71,100
24	>50	3.61	85,480	28,506
25	>50	2.9	171,904	57,722
26	>50	2.89	132,036	44,384
27	>50	2.32	112,374	36,678
28	>50	2.72	101,930	33,056
29	>50	3.18	105,106	37,644
30	>50	2.8	113,804	37,094
31	>50	3.53	131,446	43,006
32	>50	1.86	111,956	39,024
726	3.41	1.8	287,770	100,878
729	1.13	2.4	391,530	134,402
730 -1	3.09	1.86	228,720	79,444
730 -5	18.9	2.47	161,410	55,676
736	1.33	3.16	380,692	128,884
856	44.7	4.04	149,752	53,208
862	43.8	2.89	139,630	47,202
742	45.8	3.62	181,392	59,472
920	10.3	3.67	123,950	47,300

<조류인플루엔자 시료의 iseq100 NGS system 이용 시 샘플 별 read 수>

- 각 유전체별 read 수 및 시퀀싱 결과를 확인해본 결과, 상대적으로 크기가 큰 segment인 PB2, PB1 및 PA 유전체의 read수가 상대적으로 부족하며, 양쪽 끝이 추가적으로 증폭된 것을 확인함.
- 이는 동일 primer를 사용하는 상황에서 짧은 유전체가 우선적으로 증폭되는 상황 및 비특이 반응에 따른 것으로 보여 추가적인 최적화 작업이 필요한 것으로 판단됨.



<조류 인플루엔자 segment별 NGS coverage 분포 및 평균 depth>

- 8개의 segment로 구성된 조류인플루엔자의 경우, 단일 유전체를 갖는 병원체에 비해 NGS 조립 시 annotation에 시간이 다량 소요됨. 검체의 수가 늘어날 경우 분석이 지연될 가능성이 있어서 NGS raw data 와 metadata 파일을 입력하면 자동으로 genome assembly 및 유전자 annotation을 하고 결과를 정리하여 폴더를 생성해주는 MIRMA 자동 스크립트를 개발함.
- 개발된 MIRMA script는 50개의 바이러스 NGS data로 성능 시험을 완료함.
- 해당 기술을 적용할 경우, 준비된 NGS library를 loading한 후 3일만에 시료내에 있는 AIV의 8개 절편의 정보를 얻을 수 있음.

```

UW PICO 5.09 File: 1 Modified
#!/bin/bash

echo "Mass-executing script for Iterative Refinement Meta-Assembler
(MIRMA)"
echo ""
echo ""
echo ""

echo -n "Location_of_metadata_file_ex)/home/some/where/meta.csv: "
read meta_file
Ofile_name="date +%F" _results
mkdir $Ofile_name
mkdir $Ofile_name/segment_1
mkdir $Ofile_name/segment_2
mkdir $Ofile_name/segment_3
mkdir $Ofile_name/segment_4
mkdir $Ofile_name/segment_5
mkdir $Ofile_name/segment_6
mkdir $Ofile_name/segment_7
mkdir $Ofile_name/segment_8
Ofile="date +%I%M%S" _list.txt
Olocation="pwd" /$Ofile
metadata=$meta_file
sed -i "$metadata | while IFS='.' read -r run sample module; do
  sedrun=$(echo ${run} | sed 's///g')
  FFFILENAME=$(ls $(sedrun) *R1*)
  FFFFILENAME=$(ls $(sedrun) *R2*)
  M=$(echo ${module} | sed 's///g')
  S=$(echo ${sample} | sed 's///g' | sed 's/!/_!g' | sed 's//g')
  sed 's/(/ /g')
/home/microbiology/Desktop/Taesoo/flu-amd/IRMA $M $FFFILENAME
$FFFILENAME $Ofile_name/$S
cd $Ofile_name
cd $S
cd amended_consensus
cp *_1.fa ../segment_1
cp *_2.fa ../segment_2
cp *_3.fa ../segment_3
cp *_4.fa ../segment_4
cp *_5.fa ../segment_5
cp *_6.fa ../segment_6
cp *_7.fa ../segment_7
cp *_8.fa ../segment_8
cat *.fa > ../$(S)_all.fa
cd ../..

```

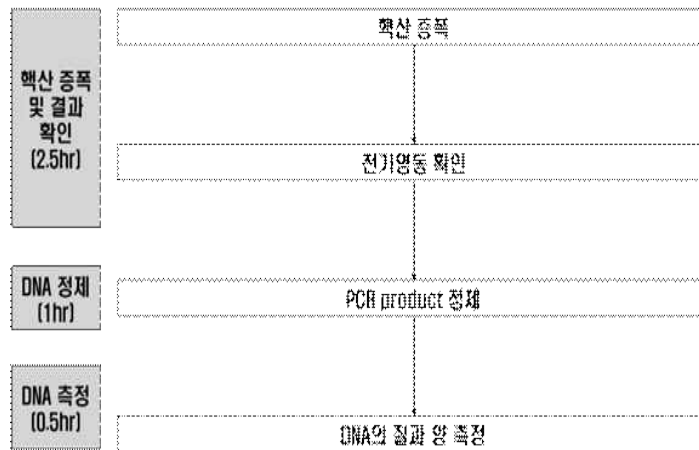
<건국대학교 개발 자동화 분석 스크립트 MIRMA script v1.0>

○ 아프리카 돼지열병바이러스 NGS 분석 표준화

- ASFV는 조직 내 낮은 농도로 존재하는 특성을 갖는 바이러스로 조직 시료에서 DNA를 추출할 경우, NGS의 표적이 되는 DNA 양이 낮아 분석이 어려우며, 유전체 상태의 국외 시료를 검사할 경우, 유전체 분석에 적합하지 않는 상태가 될 수 있음. 본 연구를 통해 ASFV의 전장유전체를 확보하기 위한 표준실험법을 수립하기 위한 문헌 조사 및 실험을 진행함.

(1) 실험 내용

- tiling amplicon whole genome sequencing을 ASFV 시료에 적용(Amanda Warr et al., bioRxiv, 2021), 해당 실험을 하기 위한 장비 및 소모품, 업무 수행 파이프라인, 세부 실험법을 작성함.



<아프리카 돼지열병 바이러스 유전자 증폭 및 정제 실험법 절차 흐름도>

- 본 연구팀은 2020년 몽골에서 발생한 ASFV 의심 시료 4건을 불활성화된 상태로 제공받음.
- 시료 내에 ASFV가 양음성 확인 및 시료 내에 viral DNA가 얼마나 존재하는지 확인하기 위해서 농림축산검역본부에서 제공한 아프리카돼지열병 항원진단 real-time PCR법을 사용함.
- 양성으로 확인된 시료들의 genotype을 확인하기 위해 ASFV genotyping PCR을 진행 후 genotype II에 속하는 2개의 시료를 선정하여 전장유전체 확보 방법 비교분석에 사용함.

<표 > ASFV real-time PCR primer 및 probe 정보

Target gene	Sequence (5'→3')
p72	(F) CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
	(R) GATACCACAAGATC(AG)GCCGT
	(probe)FAM 5'-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG- 3' TAMRA

<표 > ASF genotyping PCR primer 정보

Target gene	Sequence (5'→3')	bp
p72	(F) GGCACAAGTTCGGACATGT	478
	(R) GTACTGTAACGCAGCACAG	

<표 > '20년 몽골 ASF 의심 시료의 ASFV real-time PCR의 Ct 수치

Sample	Ct Value
Mongol_1	Undetected
Mongol_2	Undetected
Mongol_3	24.98
Mongol_4	16.92

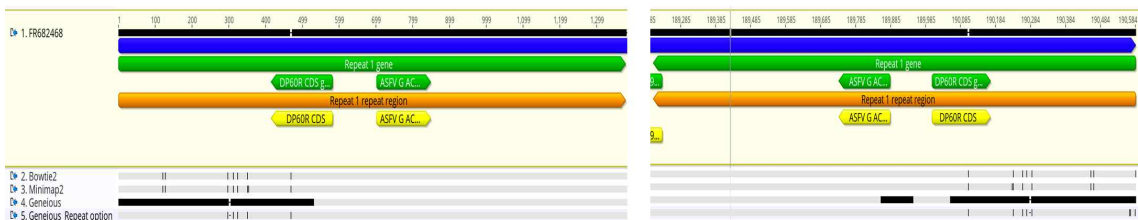
- 몽골에서 수렴한 ASFV 시료를 이용해 reference-based genome assembly 방법을 비교분석함.
- ASFV의 경우, 유전체 내 반복부분이 많아 효율적인 short read sequencing이 어려운 실정임. NGS 정보를 Reference mapping 기법으로 전장유전체를 확보할 시 사용되는 bioinformatics tool 중 Minimap2, Bowtie 2, Geneious assembler 세 가지를 본 시료를 이용해 비교분석함.

(2) assembly법 비교 실험 결과

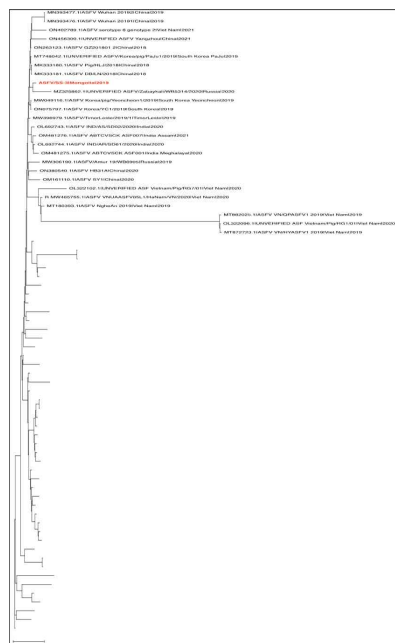
- 실험 결과, 기본 Geneious를 이용한 조립 방법이 조립 read가 가장 적고, 반복구간으로 인한 gap이 생겼으며, 전장유전체를 얻지 못함. 기본 Geneious를 제외한 나머지 방법에서 반복구간의 gap 없이 전장유전체를 확보하였으며, 세가지 유전자 조립 프로그램 중 Minimap2가 가장 적은 시간이 소요됨.
- 분석한 바이러스는 Georgia-07-like genotype II와 높은 상동성(>97%)을 보이며, 동부 유럽과 아시아에서 분리된 바이러스와 cluster를 이룸. 러시아와 몽골 국경지역에서 분리된 ASFV/Zabaykali/WB5314/2020 바이러스와 cluster 됨.

조립 소프트웨어	조립 소요 시간	조립된 read의 수	반복 1 구간의 gaps	전장 유전체 확보유무
Bowtie2	16 분	110,924	No	Yes
Minimap2	11 분	111,352	No	Yes
Geneious	1시간 42분	107,786	Yes	No
Geneious (Repeat region option on)	4시간	111,444	No	Yes

<표. 몽골 ASFV 전장유전체 조립 소프트웨어별 소요시간, read 수, gap · 유전체 확보 유무>



<Geneious를 이용한 전장유전체 시각화>



<전장 유전체를 이용한 ASFV의 Maximum-likelihood phylogenetic tree>

(3) 전장유전체 확보 시험법 개선을 위한 비교연구

- 정확한 ASFV의 계통학적 분석을 위해서는 ASFV의 전장유전체를 확보할 필요가 있음. 따라서, 1) 처리과정 없이 Illumina Sequencing, 2) Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing, 3) Probe-Capture 후 Illumina Sequencing 방법을 통해 전장유전체 확보를 시도 및 해당 방법을 비교 분석함.

1) 증폭과정 없는 Illumina Sequencing 방법

- Nanodrop p1000을 사용하여 시료 핵산의 260/280과 260/230을 측정하고 Quantus Fluorometer를 이용하여 DNA의 농도를 측정함.
- DNA의 농도는 Illumina sequencing을 진행하기에 충분하나 260/280과 260/230이 부적합하다면 CleanNGS를 이용하여 핵산의 clean up을 진행한 후 Quality를 재측정 후 Illumina sequencing을 진행함.
- TruSeq Nano DNA Library Kit를 사용하여 Library를 제작하고 Nextseq 550을 사용하여 Illumina Sequencing을 진행함.
- 시료 Mongol_3과 시료 Mongol_4의 DNA 농도, 260/280 수치, 260/230 수치는 아래 <표 >와 같음. 두 샘플 모두 Illumina Sequencing을 진행하기에는 DNA 농도가 충분하나 260/230이 낮은 것으로 보아 많은 Contaminant들이 시료 내에 존재하는 것을 유추할 수 있음. 시료 Mongol_3과 시료 Mongol_4를 별다른 처리과정 없이 Illumina Sequencing을 진행한 결과 ASFV에 속하는 read는 발견되지 않았음.
- 따라서 외국에서 제공받은 DNA 시료에 대해서 NGS를 진행할 시 처리과정 없이 진행하는 것은 부적합함.

<표 > '20년 몽골 ASF 의심 시료의 ASFV real-time PCR의 Ct 수치

	DNA 농도 (ng/ul)	260/280	260/230
Mongol_3	1.48	1.73	1.21
Mongol_4	1.01	1.69	1.03

2) Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing 방법

- ASFV의 농도를 높이기 위해서 Amplicon PCR을 진행함. Amplicon PCR의 primer 염기서열, PCR premix 조성, PCR 조건은 각각 아래와 같음.
- Amplicon PCR을 진행한 후 전기영동을 통해서 PCR band가 존재하는 것으로 amplicon PCR의 결과를 확인함.
- AMPure XP Reagent를 사용하여 Amplicon PCR product를 정제하고 핵산의 clean up을 진행함.
- 정제된 Amplicon PCR product은 Nanodrop p1000을 사용하여 시료 핵산의 260/280과 260/230을 측정하고 Quantus Fluorometer를 이용하여 DNA의 농도를 측정하고 TruSeq Nano DNA Library Kit를 사용하여 Library를 제작하고 Nextseq 550을 사용하여 Illumina Sequencing을 진행함.

<표. ASF 핵산 증폭 시험 PCR premix 조성>

Components	Volume (ul)
Distilled Water	15
2X Phusion Master Mix + 1mM MgCl ₂	25
Primer pool	5
Template DNA	5
Total	50

<표. ASF primer pool의 조성>

Primer Pair	Sequence (5'-3')	Pool Concentration	Pool
1	GGCGTTCAATTCACAAGATGC	X1	P1
	ACGGCATCTAAGCAGCTCAATG	X1	

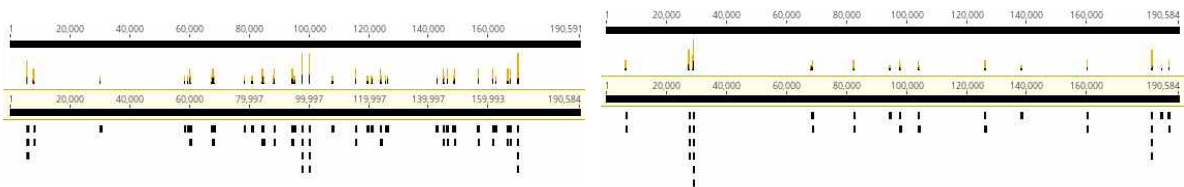
2	CAGGCCGATATATCATTTCATCAATATTCA	1X	Even
	ACCCAAAGCCCTGGAATCCTTA	1X	
3	GCAAACCAAGTGACTCACCCCTC	0.75X	Odd
	ATTGTATGACGTCGGGGCAGAT	0.75X	
4	ACCTAGTAAAAGTCCTAGAAAAACCTTCA	2X	Even
	CGCCATTGTTTTACACAGTCGC	2X	
5	TCGAGATTTTATTATTTGGATGCATCATCA	2X	Odd
	GGACTGATGAAAGCCGTGAA	2X	
6	TCCACGCGGTA CTTGGCTCC	0.5X	Even
	AGGCCTCGTTGGTGGAAAGGA	0.5X	
7	AGGGCTGATGCAAATCTCTTTTTCA	1X	Odd
	TCTCCGATTTTCGCATGCCAAA	1X	
8	AGTTTGCAAAGAGCCTAAAGATAGACT	1.5X	Even
	AGCGTGGAAGTGTAGATGACGA	1.5X	
9	TGCAGAAACCGCAGATGAATGT	1X	Odd
	ATAGGATTAGATGCGACGCCAA	1X	
10	GCATGTAGAGAGGTTTTGGTAGTCA	2X	Even
	GGAAACAGCTGGAGAGTTGTGG	2X	
11	TGGTTTTGAAATAAAATGCCTTCTACGG	1X	Odd
	GGAATGCATGGACGAAGAAGCA	1X	
12	CTATGGGATGGGAAGAGTGGTCAA	1X	Odd
	CGTCAACCGCCGCATTAGC	1X	
13	TCCTTGGGAGTTACAGCGAAGA	2X	Even
	AATGAAATCATTCCGCGGCGAGT	2X	
14	CAGACATTGGCAGTGATGGCTA	1X	Odd
	GAAATGCCGGGCCTTCTACAAA	1X	
15	GCTACTCCCCAAATATCACATATAATTGT	2.5X	Even
	TTTTTCGTGTTGCTGTTCCGGGA	2.5X	
16	GGATGGCACCCCTTCTCACAAATC	1X	Odd
	TGCGTATGACCCGATGTTGTTG	1X	
17	GTCGACTTCACAGGAACAACGG	1X	Even
	ACCCGCTTTACACAAAACAGT	1X	
18	TGGAATTTCTGACGTGGCAA	1.5X	Odd
	GCAACCGCTATTCCAAACAGGA	1.5X	
19	AGTTGTTGCTTAGACCGTGGCA	1.5X	Even
	TGAAAAGGAGGGCACGATCC	1.5X	
20	CCCGTATGCGGGCGTACTTT	1X	Odd
	TGGCCTCTTCTTTCCCCGA	1X	
21	GGCCGCAACATTTGTGTCAAAG	1X	Even
	GCTCGGAACAAATTACTCCA	1X	
22	GAATGGCAGCGATGATCTCAGG	1X	Odd
	TGCAGGGCAAGGGTATACTGAA	1X	
23	TGGCGTCGTTTAACAGCTTGAT	1.5X	Even
	GCTGGATGGCAAATCGTTGTA	1.5X	
24	AGGCGTGAAAATTTCTTCTCAAACA	1X	Odd
	AGACGTTTTAAGCTGCATGGCA	1X	
25	GGCAGCAGGATCTTAAAACCGG	1.5X	Even
	TGCATAATGCCAGCTTTTCGT	1.5X	
26	GCTGTTTAAGCGTTTCAAGCTGA	2X	Odd
	CTCCGCGGGGAACATTGTTTTA	2X	
27	CCCTGGGAGGAGTCATCATGAA	1.5X	Even
	GGTCATTGACTTTGGAAGCGCT	1.5X	
28	ACTGTCTGCTAGACTCCCAGGA	1X	Odd
	CCCAAGAGGAGGAATGGTTTTGC	1X	
29	GCCCCCTAGCGTCACCGAAT	0.75X	Even
	CCAAGCCTGCTGCGAAGCTC	0.75X	
30	GACGCAATTTCCGGCTGTTTTTAAAA	1X	Odd
	GACTTGGTCTCCGGCTCAAAG	1X	
31	GTTGGGGTGTGGAGCGAATAA	1.5X	Even
	TTCTGCTTACGGACGATGCAAC	1.5X	
32	TAGTTGTGAAGCGTTCTCGGGT	0.5X	Odd
	GAGCACATGTTACTCGCCACTC	0.5X	

33	GGACTTCTTATGCTCAGATGGGC	1X	Even
	ACTGCTGCAGGCGTTAAACATT	1X	

<표. ASF 전장 유전체 PCR 조건>

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	10 sec	33
Annealing	63°C	30 sec	
Extension	72°C	40 sec	
Final Extension	72°C	10 min	1

- Mongol_3과 Mongol_4 시료에서 Amplicon PCR을 진행한 후 전기영동을 통해서 7kb의 PCR band를 확인함. AMPure XP Reagent를 사용하여 Amplicon PCR product를 정제하고 Illumina Sequencing을 진행함. Mongol_3과 Mongol_4의 Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보를 ASFV Georgia 2007/1 유전체에 Bowtie2를 사용하여 reference mapping을 진행한 결과는 각각 <그림 >, <그림 >와 같음. Mongol_3와 Mongol_4의 Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보 중 mapping되는 read는 각각 53개와 37개임.
- 증폭과정 없이 유전체 정보를 생산하는 방법보다 Amplicon PCR을 진행한 후 유전체 정보를 생산하는 방법이 더 많은 ASFV의 유전체 정보를 확보할 수 있음. 그러나 Amplicon PCR을 진행한 후 유전체 정보를 생산하여도 유전역학에 필요한 데이터 양을 충족할 수 없음.

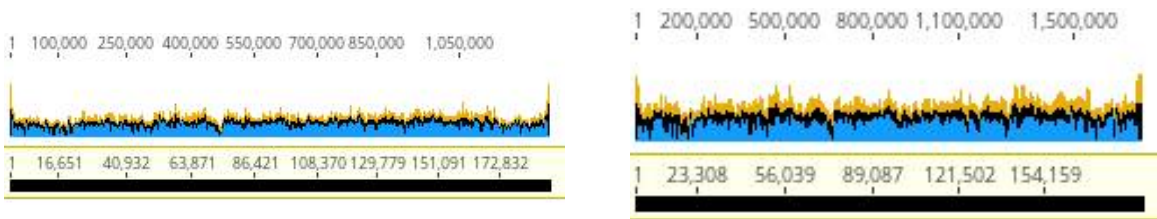


<그림 > Mongol_3(왼) 및 Mongol_4(오)의 Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보를 Reference Mapping한 결과

3) Probe-Capture 후 Illumina Sequencing 방법

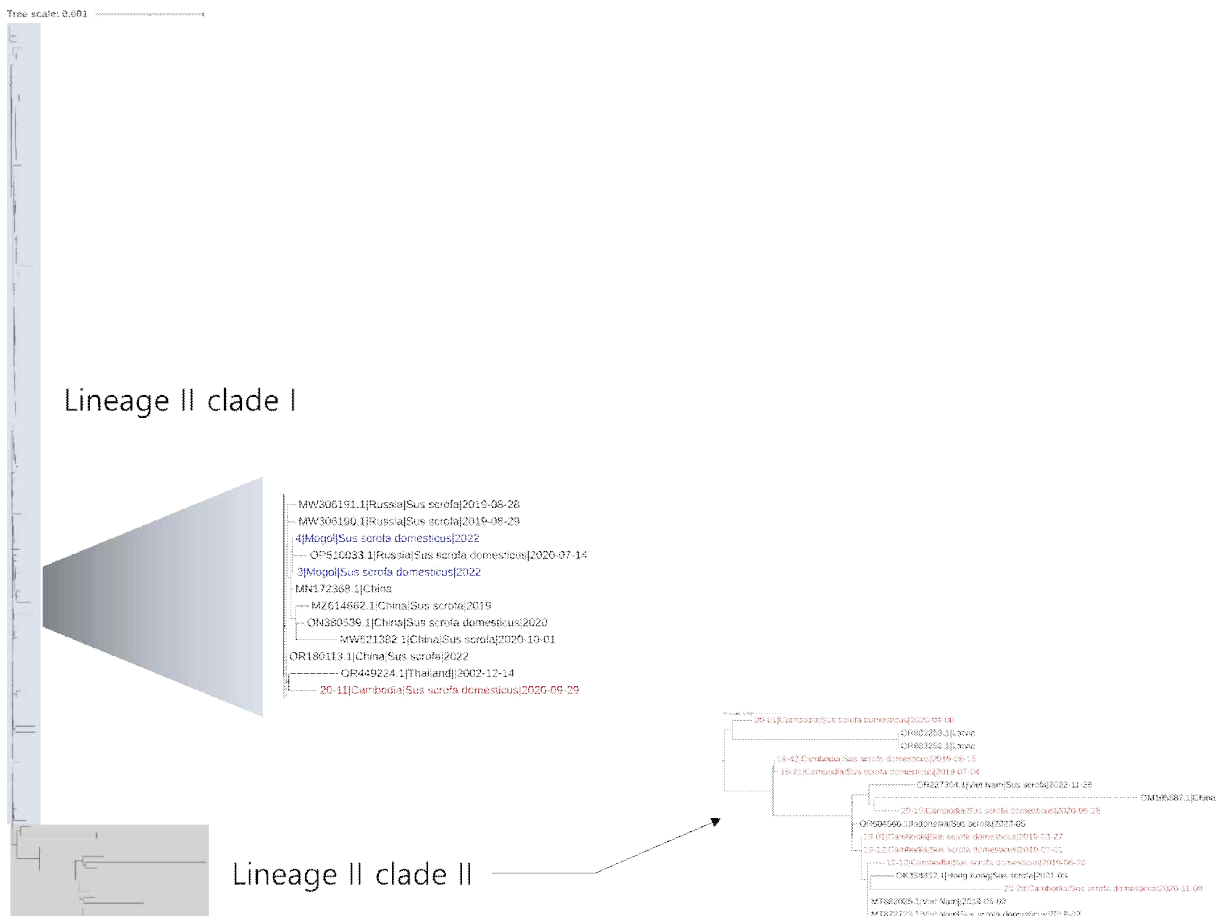
- Nanodrop p1000을 사용하여 시료 핵산의 260/280과 260/230을 측정하고 Quantus Fluorometer를 이용하여 DNA의 농도를 측정하고 TruSeq Nano DNA Library Kit를 사용하여 Library를 제작함.
- 제작된 Illumina Library는 Target Capture Probe가 달려있는 Panel을 사용하여 ASFV 핵산을 특정적으로 확보한 후 Streptavidin-coated magnetic bead를 사용하여 ASFV 핵산만을 정제함.
- 정제된 ASFV 핵산은 Nextseq 550을 사용하여 Illumina Sequencing을 진행함.
- Mongol_3과 Mongol_4 시료를 사용하여 Illumina Library를 제작한 후, Target Capture Probe가 달려있는 Panel을 사용하여 ASFV 핵산을 특정적으로 확보하고 Illumina Sequencing을 진행함. Mongol_3과 Mongol_4의 Probe-Capture 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보를 ASFV Georgia 2007/1 유전체에 Bowtie2를 사용하여 reference mapping을 진행한 결과는 각각 <그림 >, <그림 >와 같음. Mongol_3와 Mongol_4의 Probe-Capture 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보 중 mapping되는 read는 각각 1,432,929개와 1,731,876개임. 또한, 사용한 Reference 유전체의 모든 부분에 mapping되는 read가 존재하여 전장유전체를 제작할 수 있음.
- 증폭과정 없는 Illumina Sequencing 방법, Amplicon PCR 진행 후 Illumina Sequencing 방법, Probe-Capture 후 Illumina Sequencing 방법을 비교한 결과, 유일하게 Probe-Capture 후 Illumina Sequencing 방법으로 생산한 유전체 정보로 전장유전체를

제작할 수 있음. 따라서, 추후 외국에서 제공받은 시료들은 Probe-Capture 후 Illumina Sequencing 방법으로 ASFV의 유전체 정보를 생산함.



<그림 > Mongol_3(원) 및 Mongol_4(오)의 Probe-Capture 후 Illumina Sequencing한 유전체 정보를 Reference Mapping한 결과

- 2020년 몽골에서 발생한 ASFV 시료 2건과 2019년~2020년 캄보디아에서 발생한 ASFV 시료 11건의 유전체 정보는 FastQC를 사용하여 Sequence Quality, GC Contents, Overrepresented sequences, Adapter 등을 확인한 후, Trimmomatic을 사용하여 trimming함. Trimming된 유전체 정보에서 돼지 유전자는 Burrow-Wheeler Aligner와 돼지/멧돼지 유전자의 reference 유전체 염기서열인 Sscrofa11.1을 사용하여 제거함.
- 돼지 유전자가 제거된 유전체 정보는 Bowtie2를 사용하여 ASFV Reference 유전체 NC_044959(African swine fever virus isolate ASFV Georgia 2007/1)에 reference mapping을 진행함.
- NCBI Virus Database에서 유라시아에서 발생한 ASFV 전장유전체를 확보하고 MAFFT를 사용하여 alignment를 진행함. Trimal을 이용하여 ASFV 서열 alignment 중 70% 미만의 서열 정보를 가진 열들은 제거함.
- NCBI Virus Database의 ASFV 전장유전체와 본 연구에서 확보한 ASFV 유전체를 가지고 진행한 계통학적 분석은 아래 <그림 >과 같음.



<그림 > 캄보디아와 몽골에서 확보한 ASFV 유전체의 계통학적 분석

- CAM20-01, CAM19-42, CAM19-21, CAM20-10, CAM19-01, CAM19-12, CAM19-10, CAM20-28의 샘플들은 동남아시아의 다른 샘플들과 새로운 clade를 형성하였음. Mongol-3, Mongol-4, CAM20-11은 유라시아에서 분리된 ASFV와 같은 clade에 속함.
- 이는 캄보디아에서 발생한 ASFV가 기존에 예상되던 유럽-중국-아시아의 전파경로가 아닌 다른 전파경로를 통해서 캄보디아나 다른 동남아시아 국가들로 유입됨을 시사함. 그러나 CAM20-11은 유라시아 ASFV clade에 속하는 것이 확인되었음. 이는 캄보디아에 ASFV의 유입경로는 2개 이상이 존재한다고 유추할 수 있음.

4) 국내 바이러스 시료 확보 및 전장 유전체 분석

- 구축된 국제 네트워크를 통해 고위험 병원체(ASFV, HPAIV 등) 수입을 위한 농림축산검역본부, 보건복지부, 산업통상자원부의 허가를 받기 위한 업무 진행.
- 건국대학교 연구진이 수년간 야생조류, 생가금농장 등에서 AIV 예찰을 진행함. 200건 이상의 바이러스를 보유함. 보유 분리주 중 NGS를 통한 전장유전체 분석을 진행할 바이러스를 선별하는 중임.
- 건국대학교 및 경북대학교 수의과대학 보유 야생조류유래 조류인플루엔자 233개 의 전장유전체 서열을 확보함 (별첨 자료1).
- 확보된 서열은 2차년도 연구기간 중 phylogenetic 분석을 포함한 심층 분석을 통해 야생조류 조류 인플루엔자의 국내·외 전파 경로 추적 연구 등에 활용할 예정임.

149. A/spot-billed 3	
150. A/Pintail/Korea/17-45/10/2(H4N6)segment7/11/20/2007	
151. A/mandarin 2	
152. A/mandarin 2	
153. A/Mallardspot-billed 2	
154. A/Mallardspot-billed 2	
155. A/Mallard/Korea/K15-262/2015(H4N6)segment7/11/21/1/2015	
156. A/Mallard/Korea/K15-142/11/2(H3N2)segment7/11/20/2015	
157. A/Mallard/Korea/K13-288/1/2/2(H2N1)segment7/11/20/2013	
158. A/Mallard/Korea/K13-265/1/2/2(H2N5)segment7/11/20/2013	
159. A/Mallard/Korea/K13-263/1/2/2(H2N1)segment7/11/20/2013	
160. A/Mallard/Korea/K13-216/1/2(H1N3)segment7/11/20/2013	
161. A/Mallard/Korea/K12-207/03/2(H3N2)segment7/12/20/2012	
162. A/Mallard/Korea/K12-162/03/2(H3N3)segment7/3/20/2012	
163. A/Mallard/Korea/K12-94/02/2(H7N1)segment7/12/20/2012	
164. A/Mallard/Korea/K11-316/1/2(H7N1)segment7/11/20/2011	
165. A/Mallard/Korea/K11-310/1/2(H7N1)segment7/11/20/2011	
166. A/Mallard/Korea/K11-282/11/2(H6N1)segment7/11/20/2011	
167. A/Mallard/Korea/K11-230/1/0/2(H3N6)segment7/10/20/2011	
168. A/Mallard/Korea/K11-166-2/1/0/2(H3N8)segment7/10/20/2011	
169. A/Mallard/Korea/K11-147-4/1/0/2(H3N6)segment7/10/20/2011	
170. A/Mallard/Korea/K11-147-4/1/0/2(H3N6)segment7/10/20/2011	
171. A/Mallard/Korea/K10-291-2/1/2(H3N6)segment7/11/20/2010	
172. A/Mallard/Korea/K10-291-2/1/2(H3N6)segment7/11/20/2010 2	
173. A/Mallard/Korea/K10-288-2/1/2(H7N9)segment7/11/20/2010	
174. A/Mallard/Korea/K10-288-2/1/2(H7N9)segment7/11/20/2010 2	
175. A/Mallard/Korea/K09-544-1/1/0/2(H4N6)segment7/10/20/2009	
176. A/Mallard/Korea/K09-542-3/1/0/2(H4N6)segment7/10/20/2009	
177. A/Mallard/Korea/K09-522-1/1/0/2(H4N6)segment7/10/20/2009	
178. A/Mallard/Korea/K09-522-1/1/0/2(H4N6)segment7/10/20/2009 2	
179. A/Mallard/Korea/K09-481/09/2(H4N6)segment7/9/20/2009	
180. A/Mallard/Korea/K09-479/09/2(H3N8)segment7/9/20/2009	
181. A/Mallard/Korea/K09-476/09/2(H4N6)segment7/9/20/2009	
182. A/Mallard/Korea/K09-453/09/2(H4N6)segment7/9/20/2009	
183. A/Mallard/Korea/K09-068/01/2(H4N6)segment7/11/20/2008	
184. A/Mallard/Korea/K08-760/1/2/2(H1N3)segment7/11/20/2008	
185. A/Mallard/Korea/K08-739/1/2/2(H1N5)segment7/11/20/2008	
186. A/Mallard/Korea/K08-739/1/2/2(H1N5)segment7/11/20/2008	
187. A/Mallard/Korea/K08-405/1/0/2(H1N3)segment7/10/20/2008	
188. A/Mallard/Korea/K08-404/1/0/2(H1N3)segment7/10/20/2008	
189. A/Mallard/Korea/K08-310/1/0/2(H3N8)segment7/10/20/2008	
190. A/Mallard/Korea/K08-193/1/0/2(H5N2)segment7/10/20/2008	
191. A/Mallard/Korea/K08-121/1/0/2(H5N2)segment7/10/20/2008	
192. A/Mallard/Korea/21-131/0/2/2(H4N6)segment7/12/20/2008	
193. A/Mallard/Korea/21-92/008/1/1/1(H7N8)segment7/12/20/2008	
194. A/Mallard/Korea/18-23/1/1/2(H1N3)segment7/11/20/2007	
195. A/Mallard/Korea/17-20/1/0/2(H5N2)segment7/10/20/2007	
196. A/Mallard/Korea/17-18/1/0/2(H5N2)segment7/10/20/2007	
197. A/Mallard/Korea/17-14/1/0/2(H5N2)segment7/10/20/2007	
198. A/Mallard/Korea/5-9/2005/1/1/1(H7N8)segment7/11/5/2005	
199. A/Mallard/Korea/5-71/01/2(H7N8)segment7/11/20/2005	
200. A/gray-lag	
201. A/common	
202. A/common 2	
203. A/common 3	
204. A/common 4	
205. A/common 5	
206. A/bean 1	
207. A/bean 2	
208. A/bean 3	
209. A/bean 4	
210. A/bean 5	

<확보된 212개의 AIV 유전자 중, M 유전자 리스트>

- 야생동물질병관리원 연구용역 과제 수행 중 분리한 고병원성 조류인플루엔자의 sequencing 을 의뢰받아 NGS 분석을 3일 이내 진행함. 분석결과를 개발된 MIRMA script를 이용하여 자동화분석 결과 H5N1 HPAI로 확인됨.

개체 번호	barcoding	아형	시료채취일	장소	주소	
730	-1	Anas poecilorhyncha	H5N1	2022-11-17	아산 곡교천	충남 아산시 염치읍 석정리 50
742	-	-	H5N1	2022-11-07	아산 곡교천	충남 아산시 염치읍 석정리 50
856	-2	Anas poecilorhyncha	H5N1	2022-11-17	안성천	경기도 안성시 공도읍 신두리 44-27
862	-1	Anas poecilorhyncha	H5N1	2022-11-17	안성천	경기도 안성시 공도읍 신두리 44-27
920	-4	Anas poecilorhyncha	H5N1	2022-11-21	청주 옥산교	충남 청주시 신촌동 506

<확인된 고병원성 조류인플루엔자 내역>

- 국내 가금에서 분리된 조류 코로나 바이러스(닭 전염성 기관지염) 시료 49건을 확보하였으며, 그 중 34건에 대한 전장 유전체 분석을 완료함 (별첨 자료2). 해당 전장 유전체는 2차년도 연구기간 중 phylogenetic 분석을 포함한 심층 분석을 통해 조류 코로나바이러스 진화 양상 분석 연구 등에 활용할 예정임.

5) HPAI 등 민간 병원체 자원 은행 구축

○ HPAI 등 국내외 병원체 및 유전자 은행 구축

- FTA 카드를 이용한 바이러스 유전체 이동 시, 적합한 시약, 추출법 선정을 위한 실험을 진행함. 현재 국내에서 구매는 불가능하나 국외에서 사용할 수 있는 병원체 유전체 수송용 QIAGEN 사의 FTA card Classic (A)과 국내에서 구매가 가능한 QIAGEN사의 FTA card DMPK-B (B)를 비교함.
- 카드 종류 : FTA card Classic (A), FTA card DMPK-B (B)
- 유전물질 종류 : RNA, cDNA, PCR product, 원시료(Allantoic fluid:AF)
- 바이러스 : 2012년 야생조류에서 분리된 H7N7 LPAI 바이러스 A/wild_bird/K12-207
- FTA card를 수령, Qiagen Qiaquick 키트를 이용해 RNA를 추출함. protocol은 내부 작성된 신규 protocol을 사용함.
- 검사항목: rRT-PCR, conventional PCR을 통한 sequencing 여부, 8개의 절편을 한번에 증폭시키는 Optil onestep RT-PCR
- 실험 결과, rRT-PCR을 이용한 Ct value는 RNA의 경우 B가, 원시료의 경우 A가 높은 값으로 검출됨. sequencing 기반 분석을 위한 PCR 검사 결과 A카드를 이용한 cDNA 수송이 가장 적합했으며, 상대적으로 작은 크기의 segment인 NA 유전자는 B카드를 이용한 cDNA와 원시료에서 검출이 가능함. onestep RT-PCR 검사 결과, A카드를 이용한 RNA와 원시료에서 증폭이 가능했고, B 카드의 경우 증폭은 가능하나, A카드에 비해 효율이 낮은 것으로 확인됨.

<표. 2012년 야생조류 유래 H7N7 바이러스 분석 결과>

	FTA card	status	sample	Ct value	PCR			Optil
					HA	HA optimized	NA	
0	None	RNA	K12-207 (H7N7)	15.18	O	N.D.	O	
1	Classic (A)	RNA		22.99	Smear	Smear	X	O
2		cDNA		N.D.	X	O	O	N.D.
3		PCR		N.D.	X	N.D.	N.D.	N.D.
4		AF		21.82	Smear	Smear	X	O
5	DMPK-B (B)	RNA		19.71	Smear	Smear	X	△
6		cDNA		N.D.	Smear	Smear	O	N.D.
7		PCR		N.D.	X	N.D.	N.D.	N.D.
8		AF		23.48	Smear	Smear	O	△

HPAI bank

- 2004년~2023년 총 20년 간 야생조류 지속 예찰을 통해 보유 중인 HPAI 바이러스를 이용해 건국대학교 수의과대학 의생명연구소 5층 BSL-3 시설 HPAI 바이러스 बैं크를 구축함.
- 178개 바이러스 균주를 확보하고 있으며, 유행년도별로 '10/11 2.3.2 H5N1, '14/16 2.3.4.4 H5N8, '16/17 2.3.4.4e H5N6, '17/18 2.3.4.4b H5N6, '20/21 2.3.4.4b H5N8, '21/22 2.3.4.4b H5N1 바이러스를 보유하고 있음.

<표. HPAI 수집 바이러스 목록>

subtype	분리 년도	분리주 수	clade
H5N1	2010	15	2.3.2
	2021	1	2.3.4.4b
	2022	6	2.3.4.4b
H5N6	2016	3	2.3.4.4e
	2017	49	2.3.4.4b
	2018	4	2.3.4.4b
H5N8	2014	56	2.3.4.4
	2020	41	2.3.4.4b
	2021	2	2.3.4.4b

○ 구축된 자원 은행 기반 국내 진단기술 평가

- 본 연구과제를 통해 구축한 자원 은행을 통해 가금아데노바이러스 (FAdV) 및 닭 전염성 빈혈 바이러스 (CAV) 등을 확보함.
- FAdV의 경우 국내 육용종계 농가 5곳에서 채취한 혈청을 농가당 80점 총 400점을 확보함. 혈청을 이용하여 B사 FAdV ELISA kit와 확보한 FAdV 균주 $10^{2.7}$ TCID₅₀/60ul를 이용한 viral neutralization (VN) test를 비교 분석함. 농장의 혈청을 이용한 본 시험에서 중화시험 대비 ELISA kit의 민감도는 99.64%이며, 특이도는 78.57%로 확인됨.

<표. 육용종계 농가 5곳 혈청의 VN test 대비 B사 ELISA kit 비교 결과>

A~E 육용종계 농가		B사 FAdV ELISA kit		
		(+)ve	(-)ve	Total
VN test	(+)ve	273 (99.64%)	1	274
	(-)ve	27	99 (78.57%)	126
Total		300	100	400

- CAV는 국내 육용종계 농가 3곳으로부터 CIAV 양성으로 확진된 육용종계군의 혈청 100점 및 CIAV가 음성으로 확인된 육용종계군의 혈청 100점을 확보함. 혈청을 이용하여 B사 및 I사의 CAV ELISA kit와 확보한 CAV 균주 $10^{2.7}$ TCID₅₀/ml을 이용한 VN test를 비교 분석함. 양성 및 음성으로 확인 된 농장의 혈청 200점을 이용한 본 시험에서 B사의 중화시험 대비 ELISA kit의 민감도는 85%, 특이도는 100%로 확인됨. I사의 민감도는 89%, 특이도는 100%로 확인됨.

<표. 육용종계 농가 3곳 혈청의 VN test 대비 B사 및 I사 ELISA kit 비교 결과>

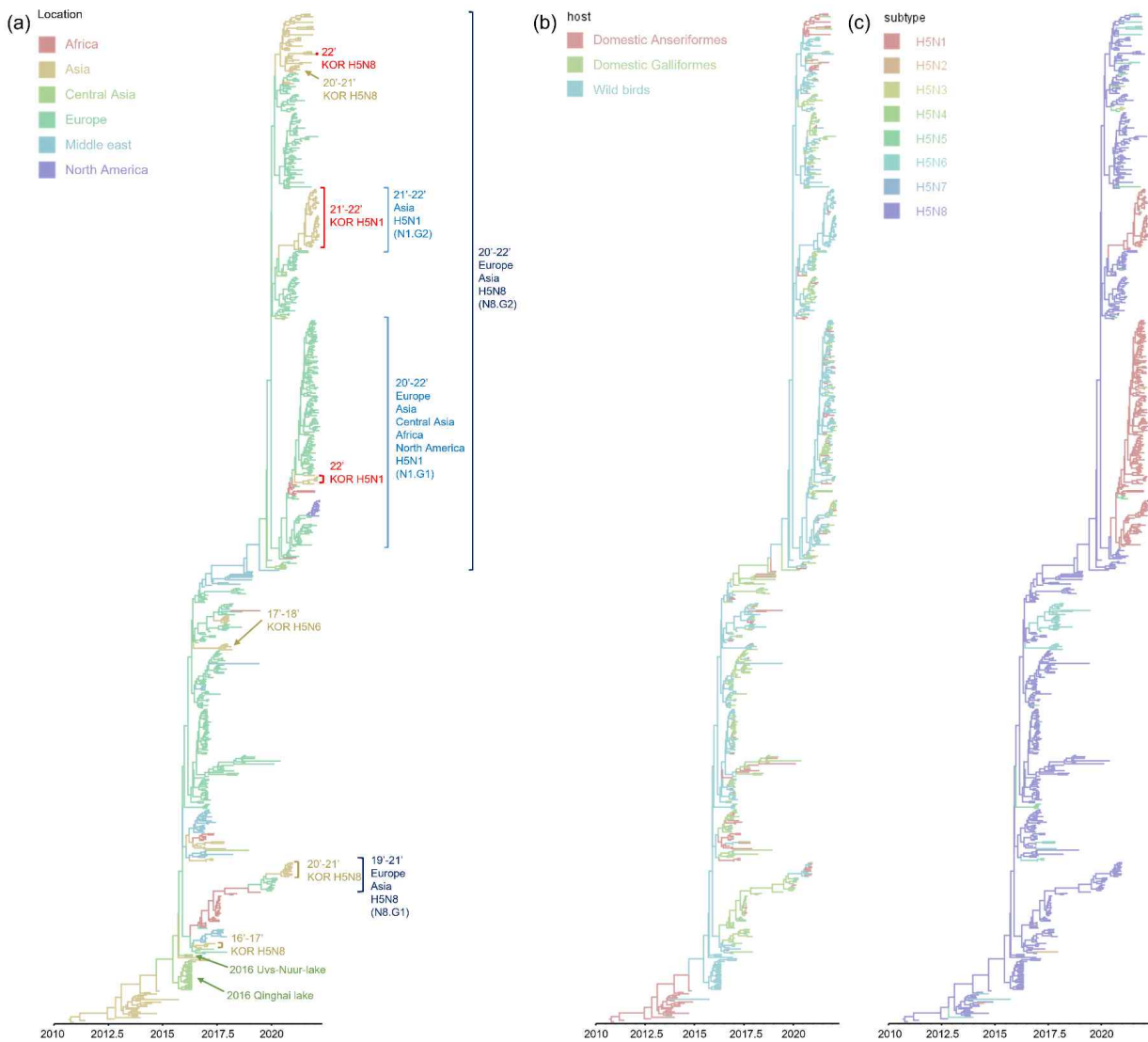
F~G 육용종계 농가		B사 CAV ELISA kit		I사 CAV ELISA kit	
		(+)ve	(-)ve	(+)ve	(-)ve
VN test	(+)ve	85 (85%)	15	89 (89%)	11
	(-)ve	0	100 (100%)	0	100 (100%)
Total		85	115	89	111

- 본 연구과제를 통해 구축한 자원 은행을 통해 AIV, ASFV, IBV 및 기타 병원체와 유전체의 지속적인 수집과 저장이 가능해져, 신속하고 정확한 진단 기술의 개발 및 국내외 진단기술의 평가에 이바지할 것으로 생각됨.

6) 신·변종 병원체 유전자 빅데이터 구축 및 분석

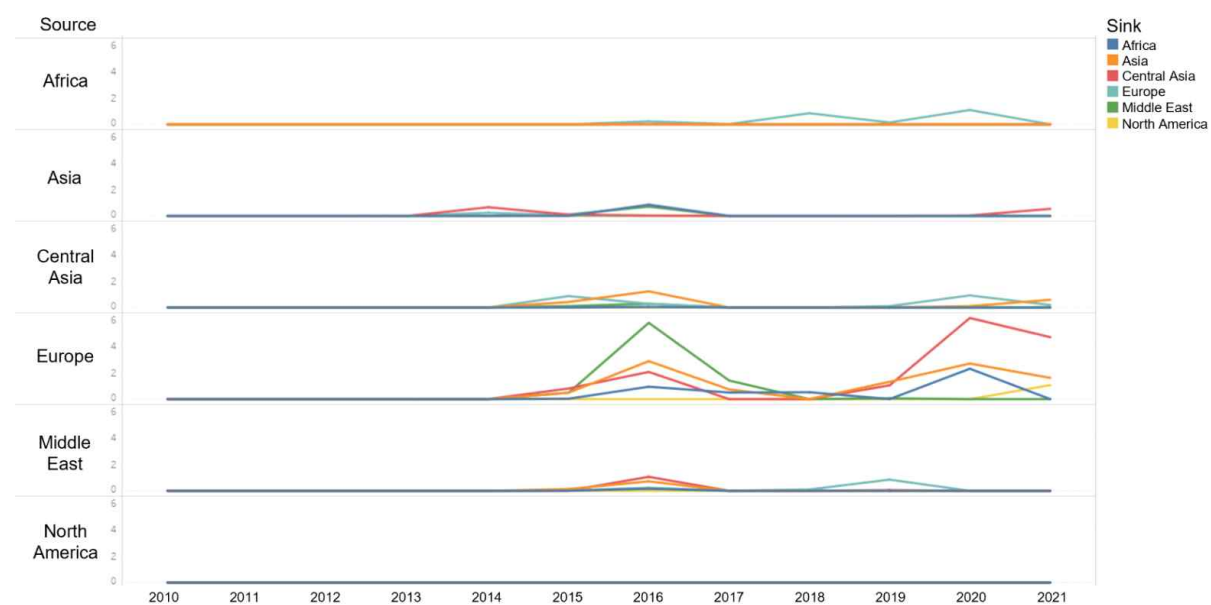
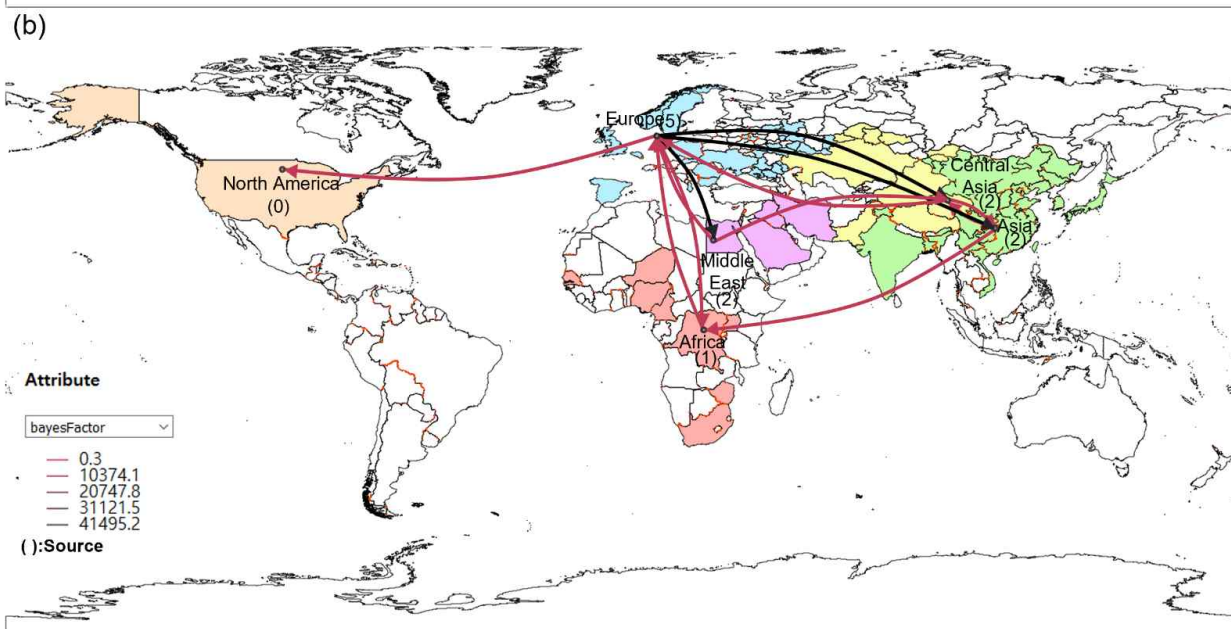
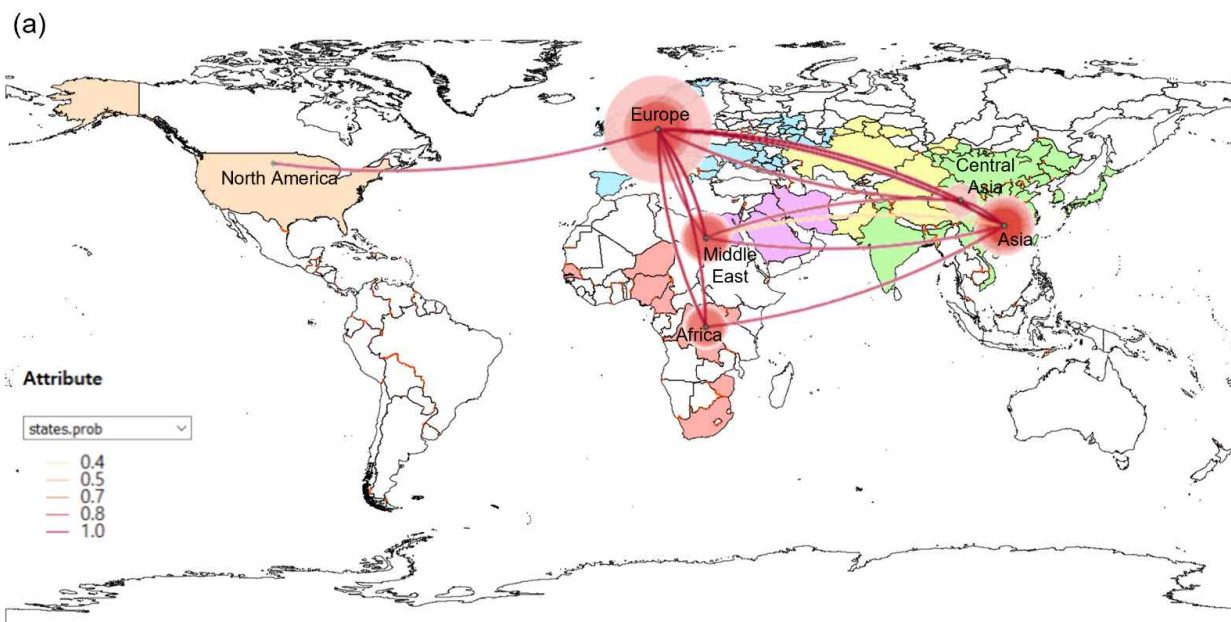
○ 고병원성 조류인플루엔자 Phylogeography 및 Phylodynamic 분석

- 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b의 국내 유입 분석 및 전파에 기여한 숙주를 분석하기 위해 phylogeography와 phylodynamic 분석 진행
- 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b는 2010년 첫 발생 이후 2016년 5월에 재발생 하였음. 분석에서 2016년 5월부터 2018년 3월까지 22개월, 2022년 11월부터 2023년 3월까지 28개월 이상 유행증임을 확인함.
- 유행 초기에는 H5N8유행하였으나 2021년 이후 H5N1이 우세하게 발생중임.
- HA 유전자 기준 고병원성 조류인플루엔자는 N8.G1, N8.G2 두 그룹으로 나뉘고 분석에 사용된 국내 분리 44개의 바이러스는 모두 N8.G2에 속하며 subtype H5N1은 또다시 N1.G1, N1.G2로 나뉘음을 확인함.



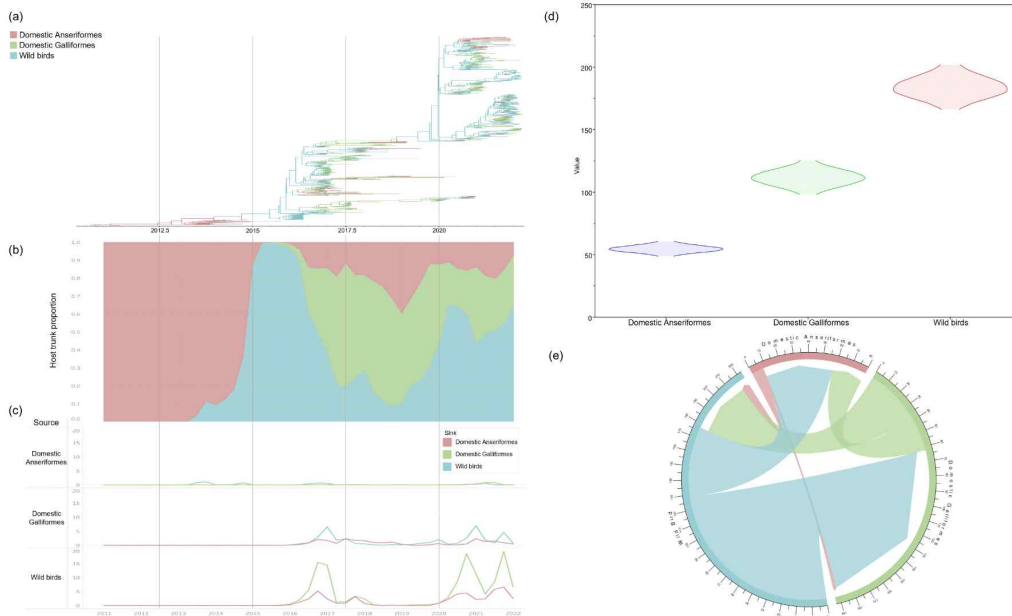
<그림. 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b phylogeography 분석 tree>

- Phylogeographic 분석을 통해 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b는 중앙아시아에 해당하는 중국의 Qinghai 호수와 Uvs-nuru호수에서 재분리 된 후 전세계로 활발하게 전파되었음을 확인함.
- Phylodynamic 분석을 통해 유럽으로 전파된 이후 유럽이 주요한 바이러스 전파원이 됨을 확인함.
- 2021년 유라시아에 국한되던 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b가 대서양을 건너 북미 대륙으로 이동함을 확인함.



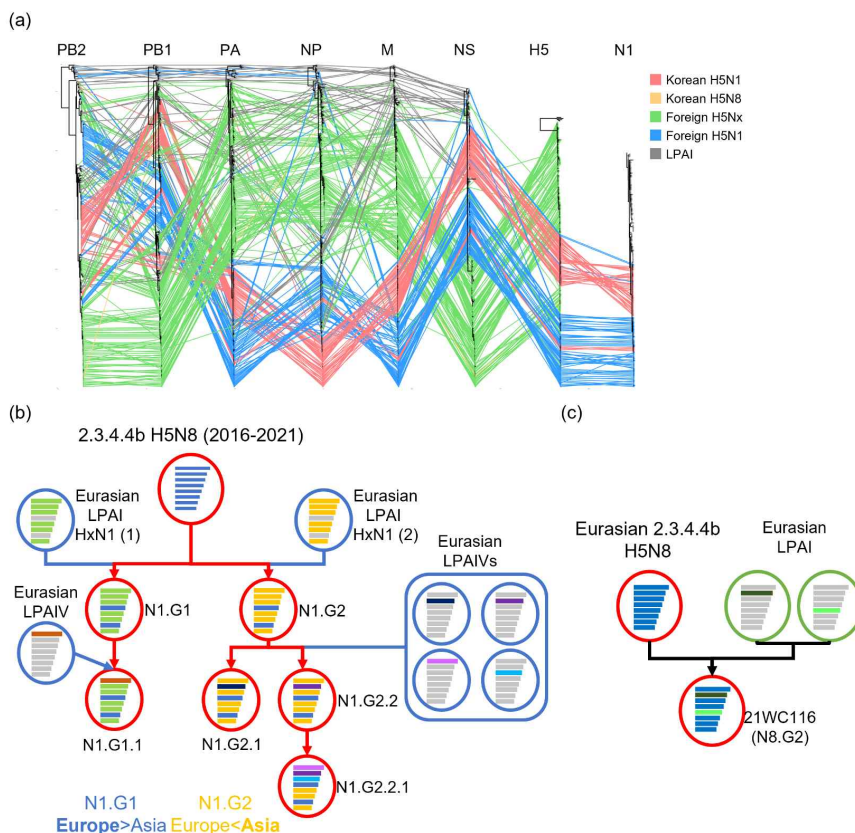
<그림. 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4b phylogeography 분석 결과>

- Phylodynamic 분석을 통해 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b의 전파에 야생조류가 주요한 역할을 함을 확인함
- 2.3.4.4b의 전파에가금류중 오리보다 닭의 기여도가 높은 것은 전세계적으로 닭 산업의 규모가 오리 산업의 규모가 크기 때문으로 사료됨.



<그림. 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b phylodynamic 분석 결과>

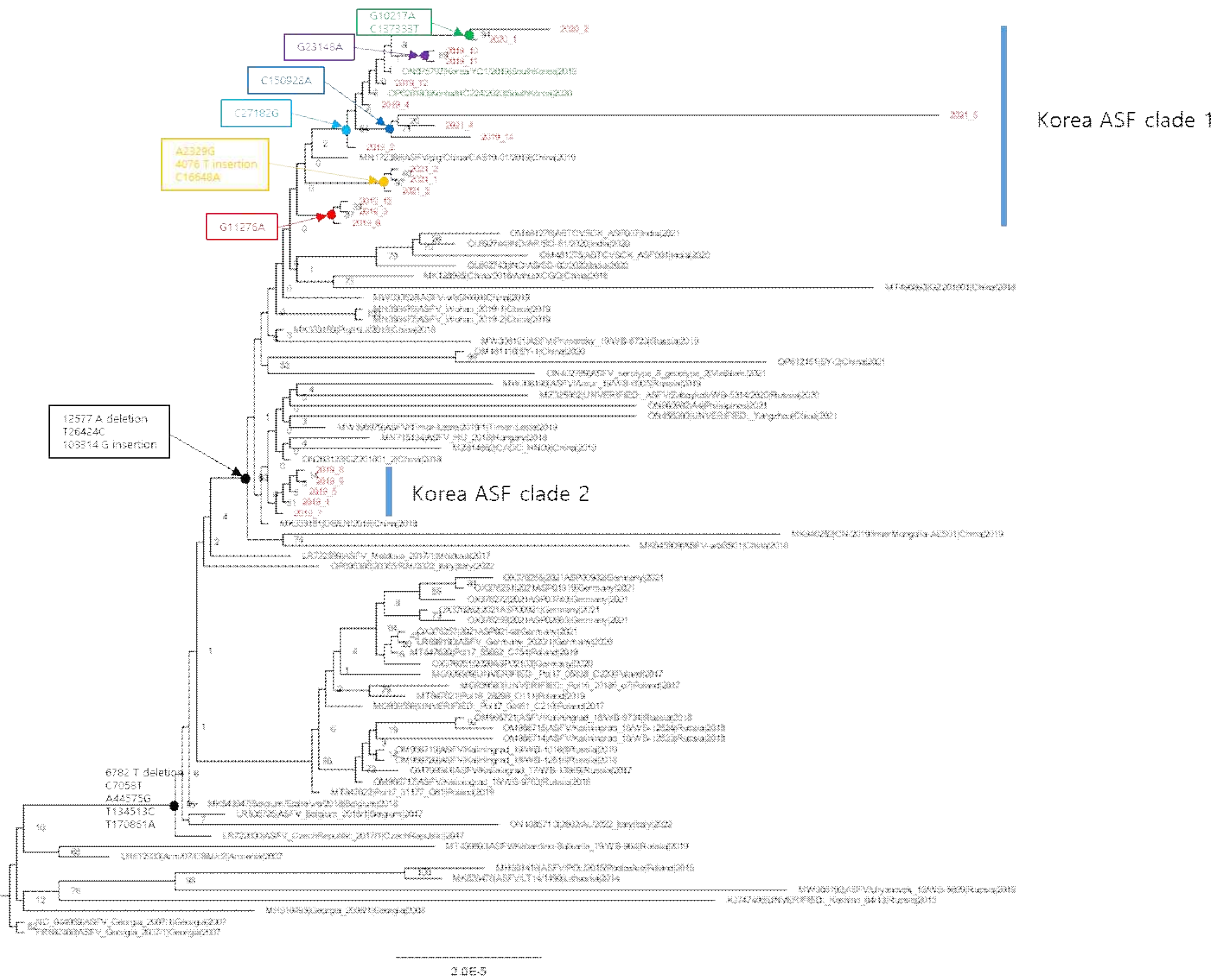
- 유전자 재배열 분석을 통해 국내 분리된 43개의 H5N1 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b의 유전형이 N1.G1, N1.G2, N1.G2.1, N1.G2.2, N1.G.2.2.1 다섯가지로 분류됨을 확인함
- 각 유전형은 유라시아 저병원성 조류인플루엔자와의 재배열을 통해 발생한 것으로 확인함.



<그림. 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b 재배열 분석 결과>

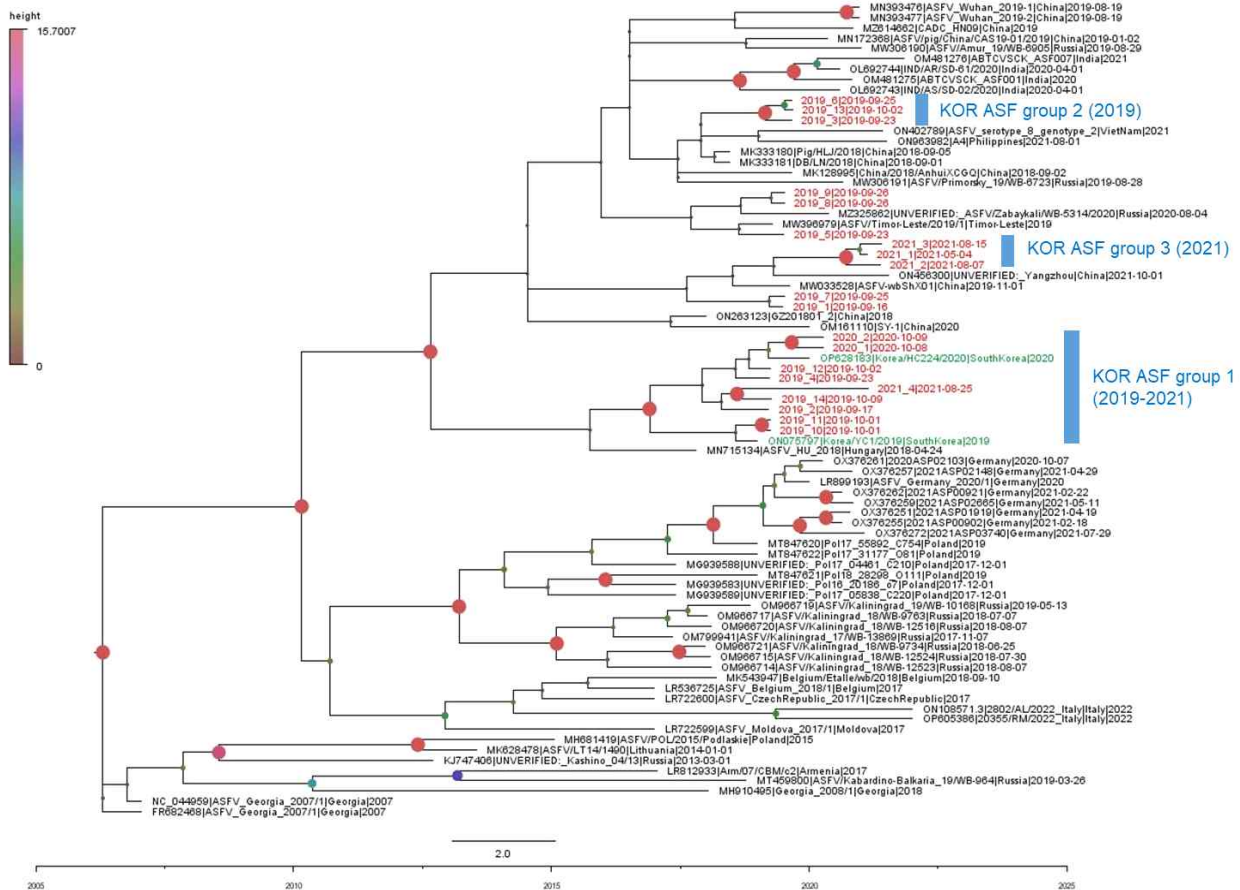
○ 국내 아프리카 돼지열병 전장유전체 기반 분석

- 국내 2019-2021년 사이 발생한 국내 아프리카돼지열병 발생 유전정보를 농림축산검역본부와 공동연구 분석을 진행함.
- NCBI Virus에서 150,000bp 이상의 아프리카돼지열병 바이러스 유전체를 다운로드 후 시퀀싱 에러가 의심되는 시료를 제거하고, 동일 국가에서 비슷한 시기에 분리된 시퀀스들은 참고 문헌에서 이용한 바이러스들을 대표 바이러스로 선정함.
- 2007년 조지아 유래 바이러스를 포함하여 총 68개 ASF 전장유전체를 phylogenetic 분석의 비교 유전체로 활용함. 농림축산검역본부에서 제공받은 21개를 추가하고, 2007년 조지아 분리주(Accession number: NC_044959) 를 분석의 root로 활용함.
- Forward 및 Reverse repeat region을 제외한 MGF 360-1La 유전자부터 ASF G ACD 01980 유전자까지를 분석의 대상으로 함.
- 대략적인 유입경로를 확인하기 위해 RaxML phylogenetic tree 분석을 실시함. (bootstrap replicates: 500) BEAST 이용 time-scaled Bayesian phylogenetic tree 분석을 위하여 2021-5 바이러스 등 일반적인 변이속도를 크게 벗어나는 sequence는 오류 또는 재조합으로 추정하고 본 분석에서는 제외함. Uncorrelated relaxed clock model, GTR substitution model, GMRF skyride tree model 등을 사용함.
- 분석에는 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) 분석 방법을 사용하였으며, 총 1억5천 회 MCMC 분석 중 1만 당 1회씩 데이터를 기록하여 총 15,000개의 phylogenetic tree 및 분석 결과를 얻음. 해당 분석을 4회 반복 실시하여 총 60,000개의 결과를 분석함.



<그림. ASFV 전장 유전체 기반 RAXML tree 분석 결과>

- 국내 ASF 바이러스는 중국, 인도, 베트남 등 아시아 지역 ASF 바이러스와 cluster를 형성하는 것이 확인되었고, 유럽의 ASF와는 확연히 구분되는 것을 확인함.
- 크게 clade 1, 2 두 개의 그룹이 확인되었으나, 전체적인 bootstrap value가 높지 않은 것으로 확인됨. ASF 느린 변이속도로 인해 cluster 구분이 명확히 되지 않는 것으로 추정됨.
- 세부적인 clade 분류 및 분화 시간 추정 등을 위해 시간(바이러스 분리일자)을 포함한 phylogenetic tree 분석을 실시하였으며 결과는 아래와 같음. 전체 ASF tree의 공동조상 출현 시점은 2006-07-23 (신뢰구간 2004-11-26 ~ 2007-07-02) 으로 조지아주 출현 시점과 유사하고, 변이속도는 4.198×10^{-6} ($2.109 \sim 6.696 \times 10^{-6}$)으로 변이속도 추정이 올바르게 이루어진 것으로 확인됨.



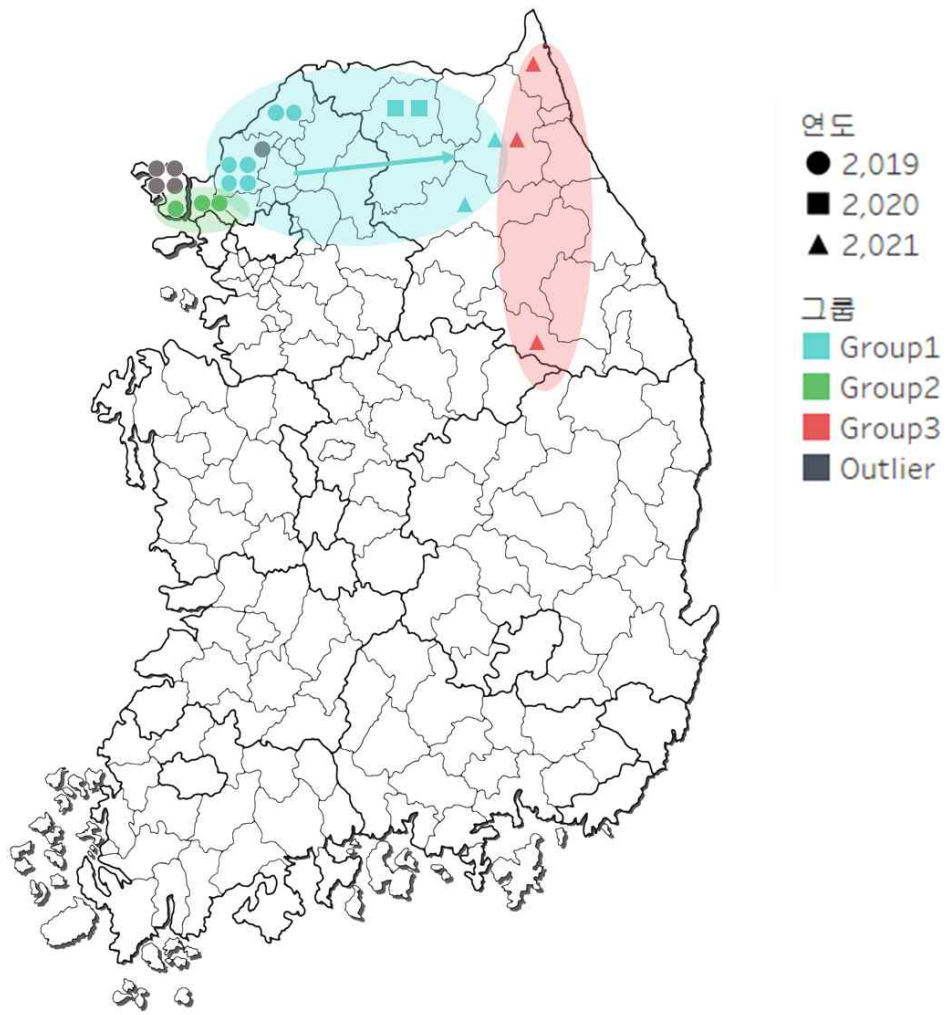
<그림. ASFV 전장유전체 기반 time-scaled tree 분석 결과>

- 2019년도부터 2021년도까지 최소 3개 이상의 그룹이 존재하는 것으로 확인되고, 2019년 1, 5, 7, 8, 9차 바이러스는 다른 바이러스와 명확한 cluster를 형성하지 않음.
- 2019년 9월 그룹1 및 그룹2 바이러스가 동시에 유입된 것으로 추정되며, 그중 그룹1은 2021년도까지 발생한 것으로 확인됨.
- 2021년에는 그룹3로 명명한 바이러스가 강원도 지역에서 발생하였으며, 기존 국내 바이러스와는 다른 그룹을 형성하는 것으로 확인됨.

<표. ASFV 전장유전체 분석 결과 및 그룹 구분>

그룹	파일명	Strain 이름	채취일
Group 1	2019_2	ASFV/Korea/Pig/Yeoncheon1/2019	17/09/2019
	2019_4	ASFV/Korea/Pig/Paju2/2019	23/09/2019
	2019_10	ASFV/Korea/Pig/Paju3/2019	01/10/2019
	2019_11	ASFV/Korea/Pig/Paju4/2019	01/10/2019
	2019_12	ASFV/Korea/Pig/Paju5/2019	02/10/2019
	2019_14	ASFV/Korea/Pig/Yeuncheon2/2019	09/10/2019
	2020_1	ASFV/Korea/Pig/Hwacheon1/2020	08/10/2020
	2020_2	ASFV/Korea/Pig/ Hwacheon2/2020	09/10/2020
	2021_4	ASFV/Korea/Pig/Hongcheon/2021	25/08/2021
Group 1 (Self-Recombinant)	2021_5	ASFV/Korea/Pig/Inje2/2021	06/10/2021
Group 2	2019_3	ASFV/Korea/Pig/Gimpo1/2019	23/09/2019
	2019_6	ASFV/Korea/Pig/ Ganghwa2 /2019	25/09/2019
	2019_13	ASFV/Korea/Pig/Gimpo2/2019	02/10/2019
Group 3	2021_1	ASFV/Korea/Pig/Yeongwol/2021	04/05/2021
	2021_2	ASFV/Korea/Pig/Goseong/2021	07/08/2021
	2021_3	ASFV/Korea/Pig/Inje1/2021	15/08/2021
Outlier	2019_1	ASFV/Korea/Pig/Paju1/2019	16/09/2019
	2019_5	ASFV Korea/Pig/Ganghwa1/2019	23/09/2019
	2019_7	ASFV/Korea/Pig/ Ganghwa3 /2019	25/09/2019
	2019_8	ASFV/Korea/Pig/ Ganghwa4 /2019	26/09/2019
	2019_9	ASFV/Korea/Pig/ Ganghwa5 /2019	26/09/2019

- Group 1 및 Group 2는 각각 연천 및 김포에서 처음 확인되었고, 이외 다른 바이러스와 cluster를 형성하지 않는 outlier 그룹이 파주 및 강화에서 확인됨. 따라서 휴전선 인근 지역을 통해 새로운 바이러스가 계속 유입하고 있음을 시사함.
- 2021년도 강원도 영월에서 최초 분리된 Group 3의 경우 휴전선 인근도 아니고, 기존 발생하던 경기 북부 지역도 아님. 비슷한 시기 발생한 고성 바이러스와 유사하여 동해안 인근 휴전선을 통해 바이러스가 유입되었을 가능성을 나타냄. 하지만 세부적인 유입경로 파악을 위해서는 멧돼지 분리주에 대한 분석이 필요함.
- 신규 바이러스 유입 차단을 위해서는 휴전선 인근 특히 강화도, 파주 등 멧돼지가 휴전선으로부터 건너올 가능성이 높은 지역에 대한 집중적인 방역관리가 필요함을 시사함.



<표. ASFV Phylogenetic 분석 기반 바이러스 분포 지도>

7) 유전체 빅데이터 기반 분자 진단 기술 개발

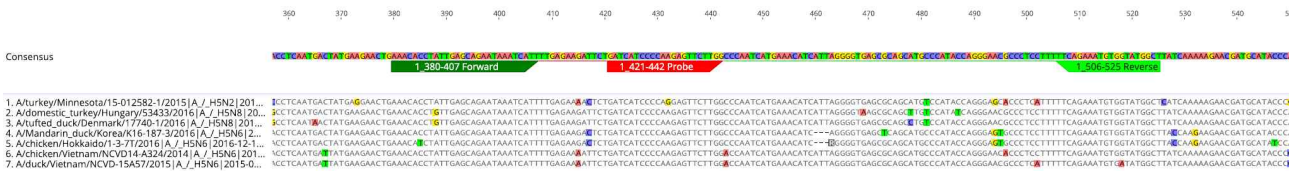
○ H5형 HPAI 바이러스 검출용 real-time PCR 시스템 개발

- 최근 clade 2.3.4.4 바이러스가 전세계에 유행하면서 subclade a-h 등 다양하게 분화 하는 것으로 확인됨.
- 기존의 H5형을 타겟으로 하는 real-time PCR 진단 법은 거의 모든 H5형을 진단하는 것을 목적으로 하여 일부 clade 2.3.4.4 바이러스에 대해 진단 민감도가 떨어지는 것을 확인함.
- 이에 따라 clade 2.3.4.4 바이러스를 집중 타겟으로 선정하여 새로운 real-time PCR 검사법을 개발하고 미국 USDA와 협력 연구를 통해 다양한 바이러스를 이용하여 진단 민감도를 확인함.

<표. H5형 검출용 real-time PCR primer 및 probe 구성>

Set	position	Sequence (5'→3')
Set1	Forward	380-407 AAACACCTRTTGAGCAGAATAAATCATT
	Reverse	421-442 GATCATCCCCARGAGTTCTTGG
	Probe	506-525 FAM 5'-AGCCATAACCACATTTCTGAA- 3' TAMRA
Set2	Forward	800-825 GAGAGTAATGGAAATTTYATTGCTCC
	Reverse	855-878 GGGACTCAACAATYATGAAAAGTG
	Probe	896-915 FAM 5'-GTTTGACATTTGGTGTTGCA- 3' TAMRA

- USDA 및 건국대학교에서 보유한 바이러스의 염기서열 정보와 비교 결과 1개 미만의 변이만 존재하는 것을 확인함.



<그림. H5 검출용 real-time PCR primer 및 probe와 clade 2.3.4.4 바이러스 간 염기서열 일치도 확인>

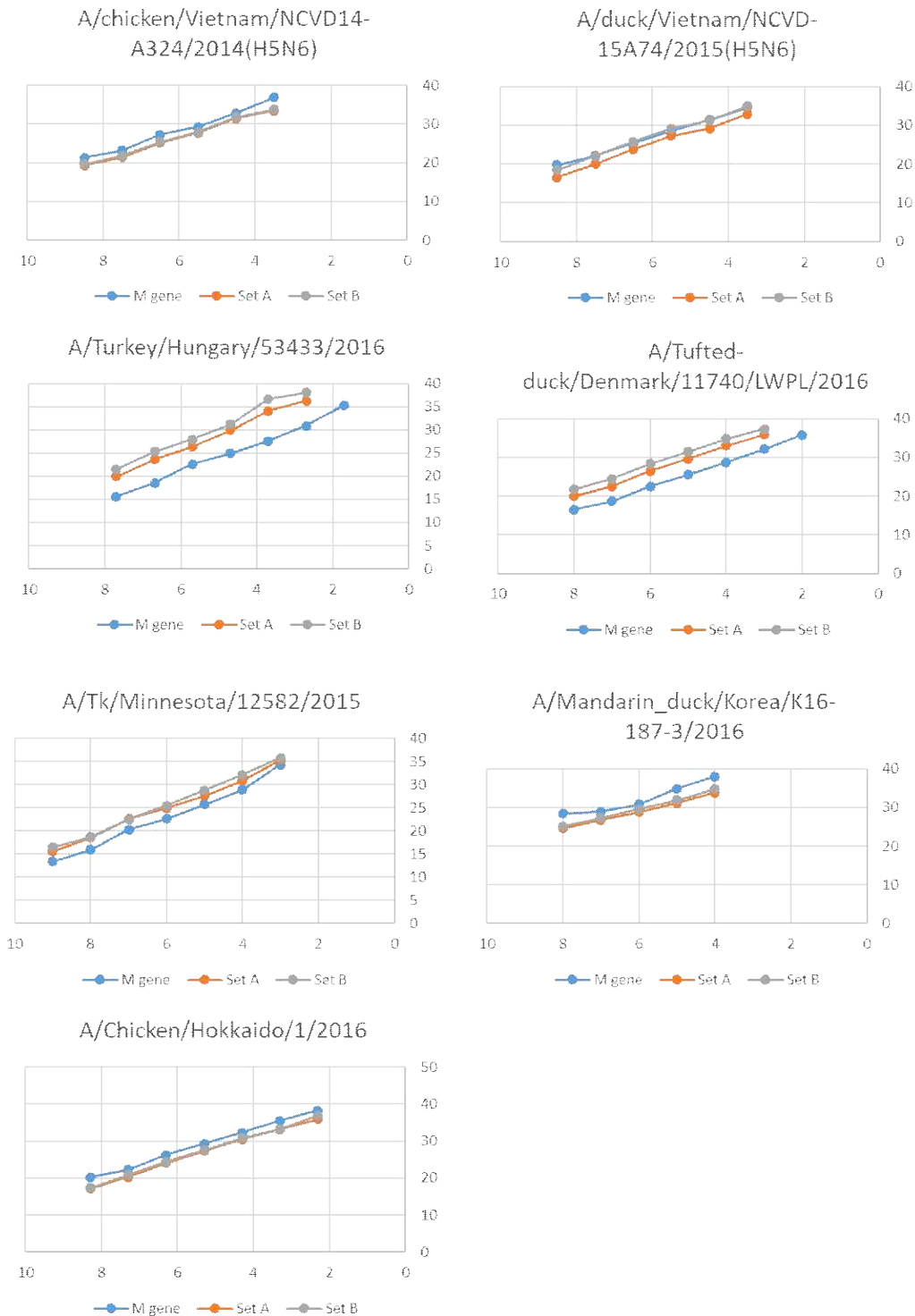
- real-time PCR 시스템 검정에 이용한 USDA 및 건국대학교 보유 바이러스는 아래와 같음.

<표. H5형 검출용 real-time PCR primer 및 probe 평가에 활용한 바이러스 목록>

Clade	Strain
2.3.4.4a	A/chicken/Vietnam/NCVD14-A324/2014(H5N6)
2.3.4.4a	A/duck/Vietnam/NCVD-15A74/2015(H5N6)
2.3.4.4b	A/Turkey/Hungary/53433/2016
2.3.4.4b	A/Tufted-duck/Denmark/11740/LWPL/2016
2.3.4.4c	A/Tk/Minnesota/12582/2015
2.3.4.4e	A/Mandarin_duck/Korea/K16-187-3/2016
2.3.4.4e	A/Chicken/Hokkaido/1/2016

- 해당 바이러스에 대해서 농도별 바이러스의 CT value를 비교 분석 결과 두가지 real-time PCR 시스템 모두 기존 M gene 대상 real-time PCR과 유사한 검출 민감도를 나타냄.

- SetA의 경우 Set B에 비하여 동일시료에서 조금 더 낮은 CT value를 나타내어 더 민감한 것으로 확인되었으며, 특히 현재 가장 유행 중인 clade 2.3.4.4b의 경우 setA 민감도가 더 높은 것으로 확인함.

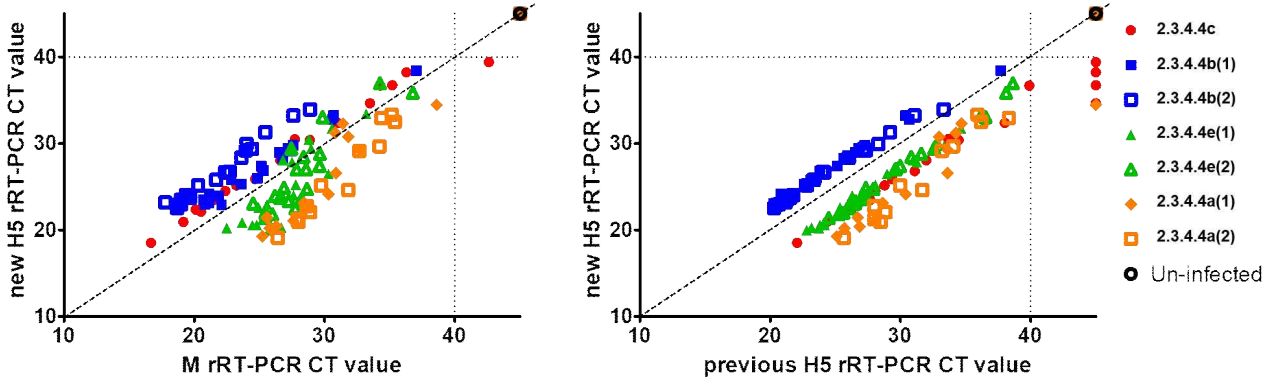


<그림. 농도별 신규 real-time PCR 적용 시 CT value 확인>

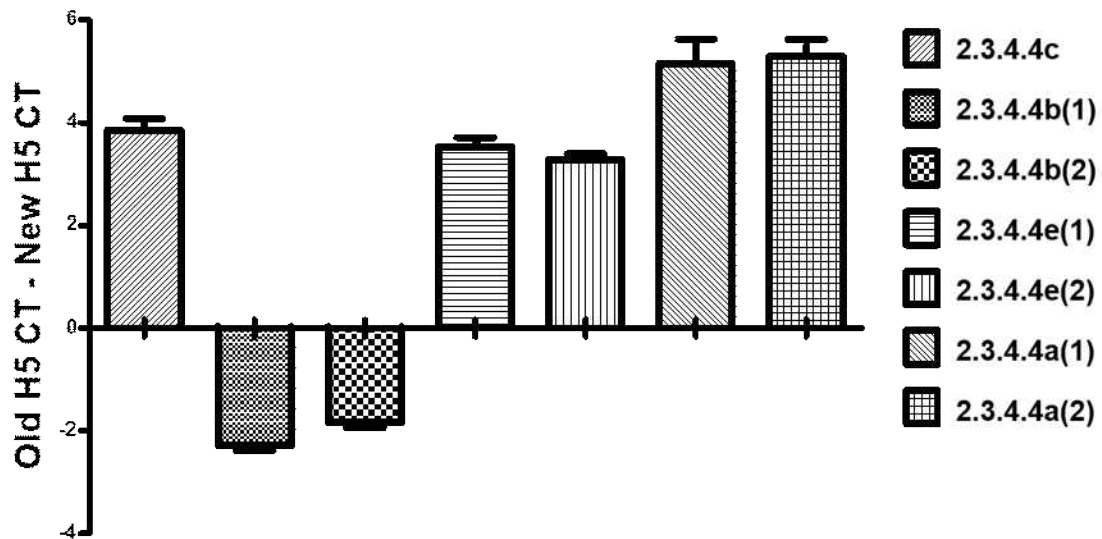
- 전체 데이터를 대상으로 M gene real-time PCR 대비 신규 H5형 real-time PCR의 CT value를 비교한 결과 두 데이터간의 높은 상관성을 나타내었으며, 2.3.4.4e, 2.3.4.4a 등 일부 바이러스에서는 오히려 M gene real-time PCR보다 높은 민감도를 보이는 것으로 확인됨.
- 미국 USDA에서 사용 중인 H5형 real-time PCR과 비교 분석 결과 2.3.4.4b를 제외한 모든 바이러스에 대해서 새로운 H5형 real-time PCR이 더 높은 민감도를 나타내는 것을

확인함.

- 새로운 clade 2.3.4.4 바이러스가 유행할 경우 본 연구에서 제작된 real-time PCR 검사법이 유용할 것으로 사료됨.
- 하지만 현재 가장 유행 중인 clade 2.3.4.4b 바이러스에 대한 민감도가 기존 검사방법 대비 뛰어나지 않아 보완 및 재평가가 필요함.



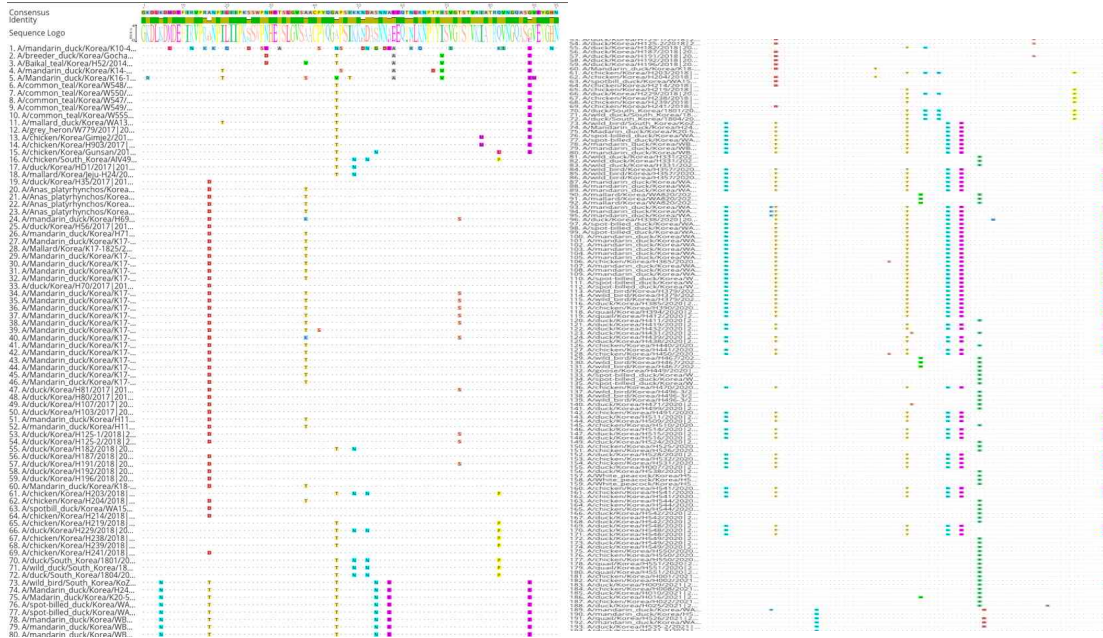
<그림. 제작한 H5형 real-time PCR 시스템과 기존 M 유전자 타겟 및 H5형 타겟 real-time PCR 시스템의 CT value 비교>



<그림. 제작한 H5형 real-time PCR 시스템과 기존 H5형 타겟 real-time PCR 시스템의 CT value 차이 비교>

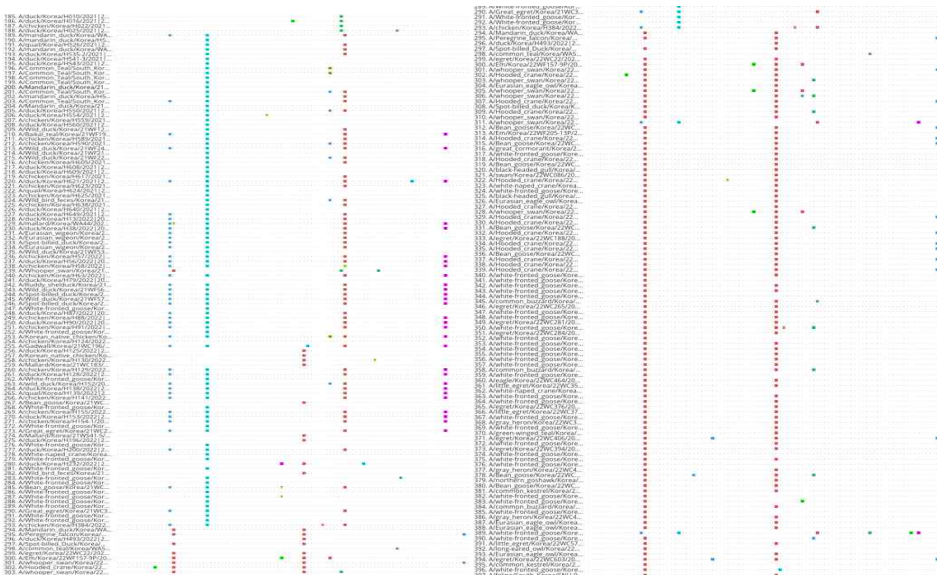
8) 유전체 빅데이터 기반 조류 바이러스 백신주 개발

○ 국내·외 병원체 간 교차 방어능 평가



<그림. 국내 유입 고병원성 조류인플루엔자 항원성 변이 부위 분석, 2010~2018 국내 고병원성 조류 인플루엔자 분리주 (원), 2020년 국내 고병원성 조류 인플루엔자 분리주 (오)>

- HPAI를 포함한 민간 병원체 자원 은행을 구축하기 위해, BL3 시설을 보유한 건국대학교 수의과대학에 지난 10년간 모아온 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스와 더불어 본 과제를 진행하며 수집한 국내외 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스와 유전체 자원 बैं크를 구축함.
- 건국대학교 수의과대학은 현재 200종 이상의 고병원성 조류 인플루엔자를 보유하고 있으며, 본 과제에서 이를 활용해 국내 유입 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 항원성 변이 부위를 (Yang et al., 2016)에 따라 다섯가지 부위 (a,b,c,d,e)로 나누고 아미노산 서열을 비교함.



<그림. 국내 유입 고병원성 조류인플루엔자 항원성 변이 부위 분석, 2022년 국내 고병원성 조류 인플루엔자 분리주 (원), 2023년 국내 고병원성 조류 인플루엔자 분리주 (오)>

- 다섯가지 부위에 따라 아미노산 변이를 비교한 결과, 고병원성 조류 인플루엔자는 2010년부터 꾸준히 항원성 변이 부위에 변이를 축적하고 있으며 각 clade별, 유전형별로 특징적인 변이를 보이고 있음.

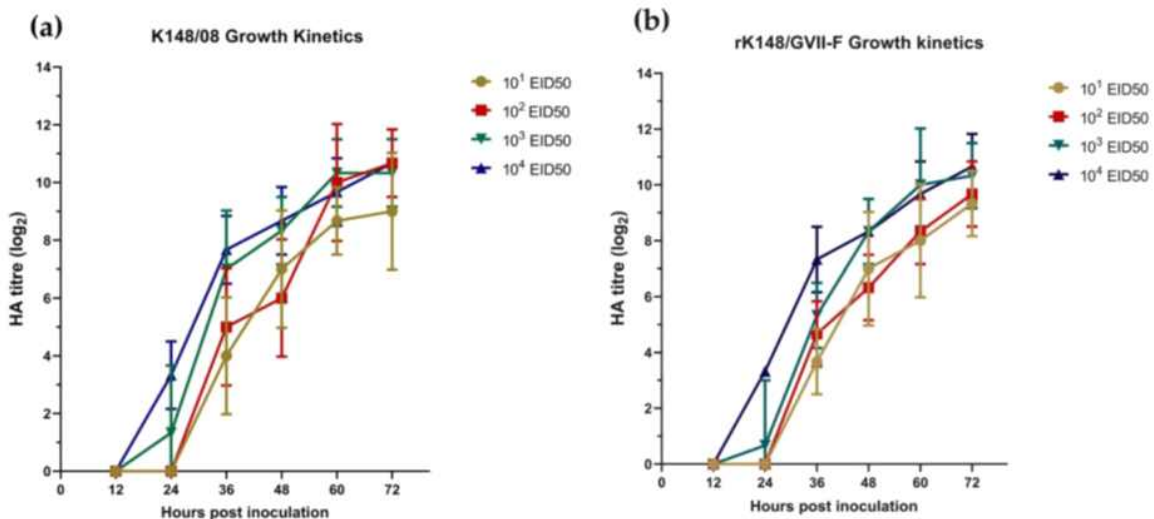


<그림. 고병원성 조류 인플루엔자 항원성 변이 부위의 Consensus Sequence Logo>

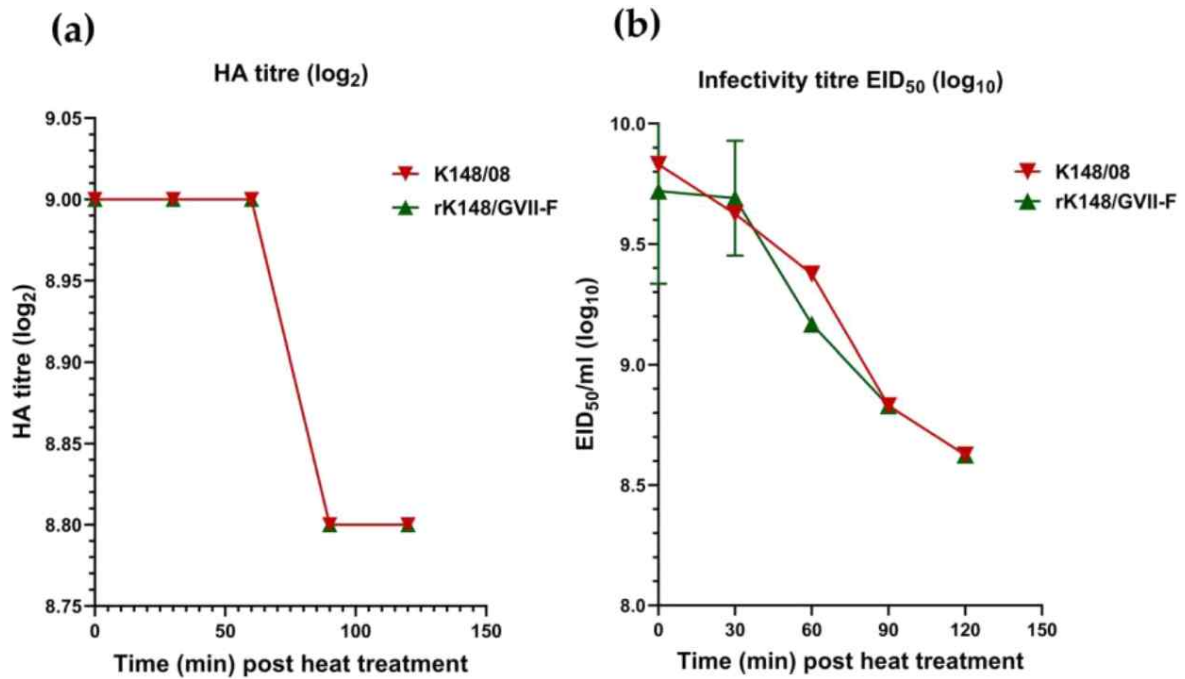
- 전체 변이 부위에 대한 Sequence Logo를 추출하여 대표적인 아미노산 서열을 확보함. 이를 추후 백신 항원 제작에 활용하여 광범위 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 백신을 개발할 수 있음.
- 2016~2018, 2020, 2022, 2023년도 국내 고병원성 조류 인플루엔자의 항원성 변이 부위를 분석한 결과, A/white-fronted_goose/Korea/22WC412/2023 (H5N1) 균주가 가장 대표성을 가졌고, 해당 균주를 활용해 교차면역원성이 높은 고병원성 조류 인플루엔자 백신 후보의 항원으로 적절할 것으로 사료됨.

○ 조류 바이러스 백신주 개발 및 특허 출원

- 본 연구과제를 통해 현 시점에 적합한 백신 유전형질을 도출해 국제적으로 활용할 수 있는 뉴캐슬바이러스 (NDV) 벡터 백신주 후보를 선별함.
- 개발된 백신은 비병원성 NDV인 K148/08주를 벡터로 사용한 키메릭 벡터 생독 백신(rK148/GVII-F)으로 K148/08내의 F 유전자를 Egypt 유래 GVII1.1의 F 유전자로 치환함.
- K148/08주와 rK148/GVII-F의 성장 곡선 및 내열성을 분석한 결과 두 바이러스의 최고 역가를 확인 시 K148/08주는 $10^{9.5}$ EID₅₀/ml, rK148/GVII-F는 $10^{9.8}$ EID₅₀/ml로 유의적인 차이가 확인되지 않음. 내열성 확인 시험에서 두 바이러스 모두 50~100분 사이에 9.00HA unit에서 8.80HA unit으로 감소하였으며, 120시간에서 $10^{8.5}$ EID₅₀/ml로 역가가 감소되어 유의성 있는 차이가 확인되지 않음.

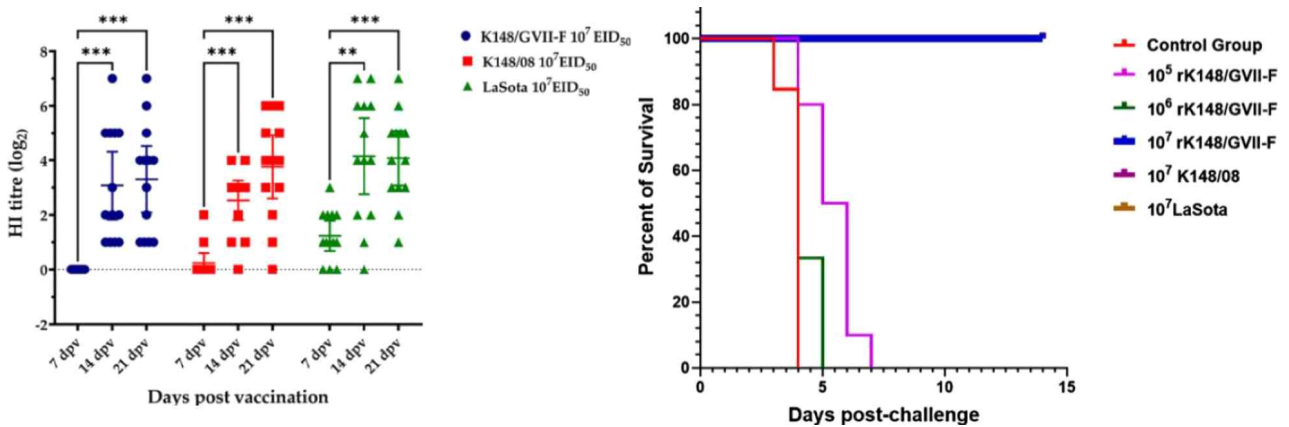


<그림. K148/08(원) 및 rK148/GVII-F(오)의 성장곡선>



<그림. K148/08 및 rK148/GVII-F의 내열성 확인 시험>

- SPF 닭을 이용한 K148/08주와 rK148/GVII-F의 혈구응집억제능(HI) assay로 확인한 면역반응과 very virulent NDV (vNDV) 공격접종 후 생존을 확인 결과는 아래 그림과 같음.



<그림. K148/08 및 rK148/GVII-F 백신 후 NDV에 대한 HI 항체가(원) 및 vNDV 공격접종 후 폐사율(오)>

- 본 연구를 통한 발명은 2010년 이후로 동남아시아 및 중동지역에서 세분화되어 양계산업에 큰 타격을 주고있는 유전형 7형 NDV에 대한 생독 백신으로 전 세계적으로 육계, 산란계 등에서 큰 피해를 유발하고 있는 NDV genotype 7에 대한 방어에 기여할 것으로 사료됨.

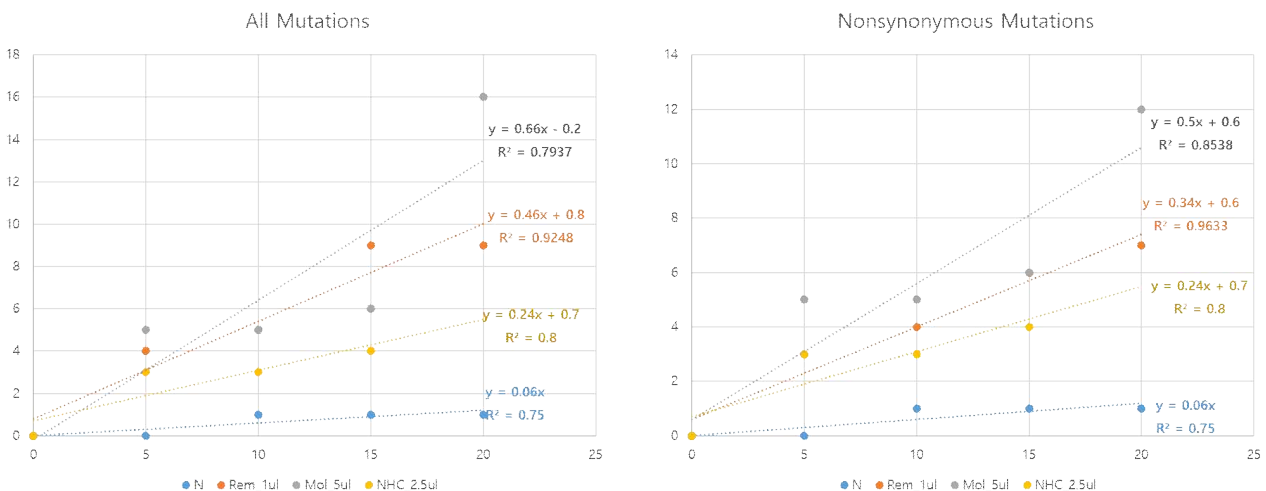
○ 뉴클레오사이드 유사체를 이용한 바이러스 약독화

- 국내 유행중인 닭 전염성기관지염 바이러스의 빠르고 효과적인 약독화를 위해 현재 유행중인 QX-like IV 유전형의 바이러스 (IBV/Chicken/Korea/22C6CT/2022)를 국내 재래시장에서 분리하여 사용.
- 바이러스를 사멸하지 않으면서 계대 과정에서 바이러스 복제 오류를 극대화시키기 위해 항바이러스제와 함께 계대 후 CT value를 측정하여 바이러스의 증폭 억제 효과 확인.
- 코로나바이러스 치료제 효과가 확인된 Remdesivir (GS-5734; Catalog No.S8932; Selleck chemicals), Molnupiravir (EIDD-2801; Catalog No.S8969; Selleck chemicals) 및 β-d-N4-hydroxycytidine (NHC, EIDD-1931; Catalog No.S0833; Selleck chemicals) 3종의 뉴클레오사이드 유사체를 이용하여 실험을 진행.
- IBV의 경우 일반적인 세포주에서는 배양이 불가하여 종란을 이용하여 실험을 진행하였고, 종란의 요막강액의 양을 약 10ml로 가정하여 최종농도를 계산

<표. 각 뉴클레오사이드 유사체 처리 농도 및 계대 후 CT value>

Antiviral	Concentration	CT value
None		14.5
Remdesivir	2μg/ml	34.2
	1μg/ml	26.3
	0.5μg/ml	24.5
	0.25μg/ml	23.2
Molnupiravir	10μg/ml	16.0
	5μg/ml	16.2
	2.5μg/ml	16.5
NHC	10μg/ml	16.3
	5μg/ml	16.4
	2.5μg/ml	15.6

○ 전장 유전체 분석을 통한 바이러스 변이확인

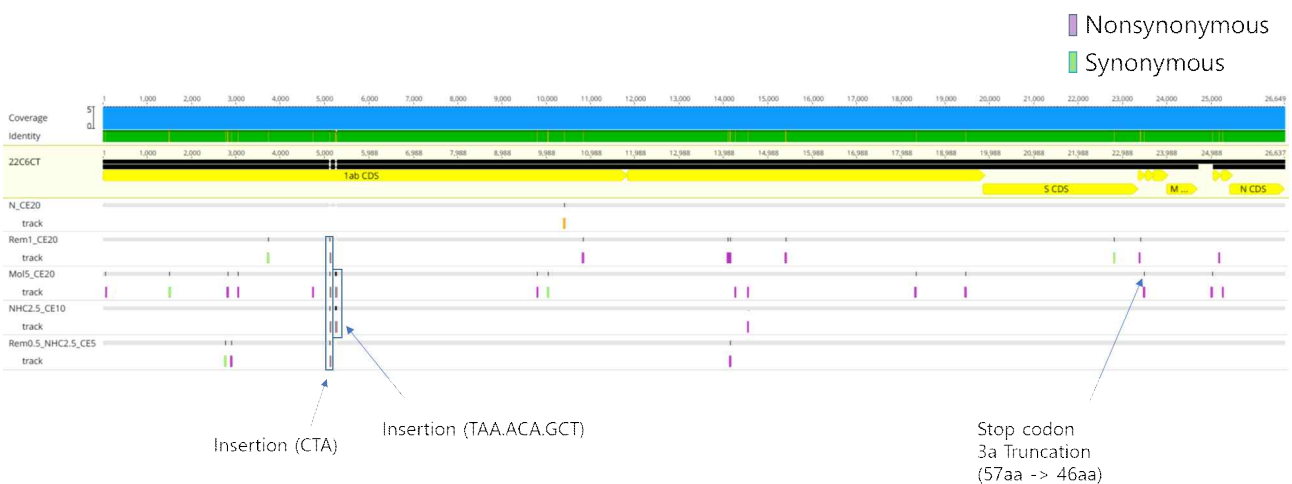


<표. Remdisivir 1μg/ml, Molnupiravir 5μg/ml, NHC 2.5μg/ml 이용 시 바이러스의 변이 발생 정도. 전체 변이 (좌) 및 Nonsynonymous mutation (우).>

- 각 뉴클레오사이드 유사체 처리와 함께 배양된 바이러스를 차세대염기서열 분석법(Next-generation sequencing)을 통해 전장 유전체 분석을 진행함.
- 농도별 실험 결과 Remdesivir 1 μ g/ml, Molnupiravir 5 μ g/ml, NHC 2.5 μ g/ml에서 바이러스의 증식을 억제하지 않으며 다수의 변이가 발생하는 것을 확인함
- 아무 처리를 하지 않은 대조군의 경우 20번의 계대 배양이 진행되는 동안 단 1개의 변이만 발생하였으나, 뉴클레오사이드 유사체를 처리한 경우 약 10배 정도의 변이속도 상승 효과가 확인됨
- Molnupiravir의 경우 20번 계대 배양 이후 16개의 변이가 발생한 것을 확인하였다. 단백질 변이가 발생하는 핵산 변이 (Nonsynonymous mutation)의 경우도 역시 약 10배 정도 높게 나타나며, Molnupiravir의 경우 11개의 Nonsynonymous mutation이 발생한 것을 확인함.

<표. 각 뉴클레오사이드 유사체 처리 농도별 변이 발생 개수>

Antiviral	Concentration	10 passage		20 passage	
		Mutation (total)	Nonsynonymous Mutation	Mutation (total)	Nonsynonymous Mutation
None		1	1	1	1
Remdesivir	1 μ g/ml	5	4	9	7
Molnupiravir	10 μ g/ml	6	3	7	4
	5 μ g/ml	5	5	16	12
	2.5 μ g/ml	3	3	-	-
NHC	10 μ g/ml	6	0	-	-
	5 μ g/ml	1	1	-	-
	2.5 μ g/ml	3	3	-	-



<그림. 뉴클레오사이드 유사체 처리 이후 변이 발생 부위 및 Nonsynonymous mutation 발생 여부>

<표. 뉴클레오사이드 유사체 처리 이후 변이 발생 부위 및 단백질 변이 발생 여부>

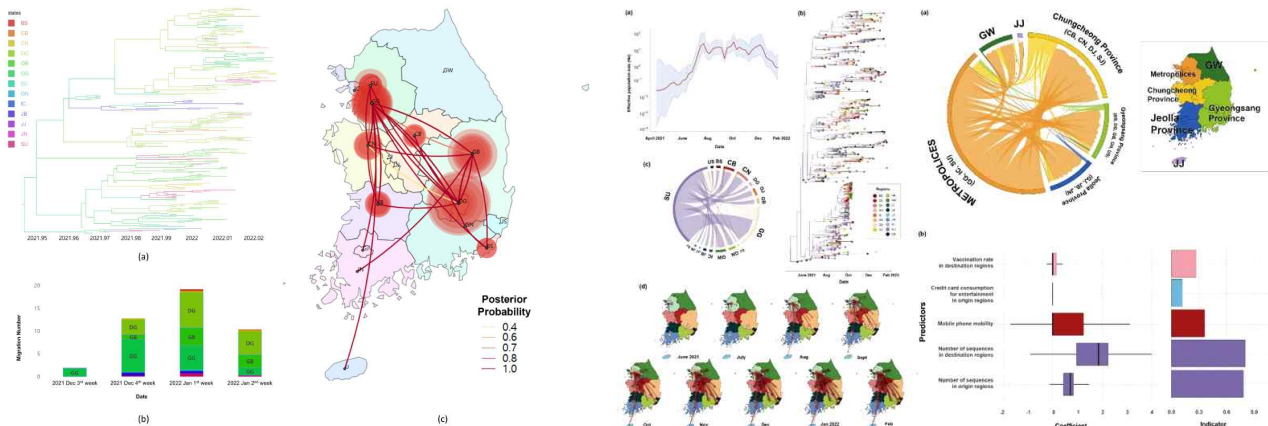
Nucleoside analogues	CDS	nucleotide number	nucleotide substitution	amino acid substitution
Remdesivir (1 µg/ml, CE20)	ORF1a	3723	A -> G	Synonymous
		5120	CTA insertion	SRE->STRE
		10819	A -> G	V -> I
		14079	G -> T	S -> A
		14143	T -> C	S -> F
		15382	T -> G	C -> F
	S	22800	C -> T	Synonymous
	3a	23382	T -> C	L -> F
5a	25166	C -> G	L -> F	
Molnupiravir (5 µg/ml, CE20)	ORF1a	65	G -> A	K -> R
		1500	C -> T	Synonymous
		2811	T -> G	E -> D
		3053	T -> C	T -> I
		4738	A -> G	A -> T
		5120	CTA insertion	SRE->STRE
		5257	AAACAGCTT insertion	TA -> TKQLA
		9800	T -> C	A -> V
		10032	C -> T	Synonymous
		14270	T -> A	Synonymous
		14551	T -> G	S -> I
		18331	A -> G	C -> Y
		19453	T -> C	A -> V
	3a	23487	T -> C	Q -> * Truncation
	NCR	25016	AA -> CG	Synonymous
5b	25263	T -> C	A -> V	
NHC (2.5 µg/ml, CE10)	ORF1a	5120	CTA insertion	SRE->STRE
		5257	AAACAGCTT insertion	TA -> TKQLA
		14551	T -> G	S -> I
Remdesivir + NHC (0.5 µg/ml+2.5 µg/ ml , CE10)	ORF1a	2760	G -> A	Synonymous
		2899	T -> G	D -> Y
		5120	CTA insertion	SRE->STRE
		14143	T -> C	S -> F
Control	ORF1a	10393	A->G	E -> K

- 바이러스 증식에 관련된 ORF1ab 부분에 다수의 nonsynonymous mutation이 발생하는 것을 확인함. Spike 단백질이 주요 면역원에 해당되어 Spike 단백질이 아닌 ORF 1ab 부분에 변이가 주로 발생한 것은 향후 면역원성의 변화 없이 병원성의 변화를 일으킬 수 있을 것으로 예측됨.
- 3가지 모두의 뉴클레오사이드 유사체 처리시 ORF1a 유전자 부위의 5120번째 CTA 유전자가 삽입되어 T 단백질이 삽입되는 결과를 나타내었고, Molnupiravir 및 NHC 처리 시 5257번째 유전자 부위에 AAACAGCTT 유전자가 삽입되어 KQL 3개의 단백질이 삽입되는 것이 확인됨.
- Molnupiravir 처리 시 3a 유전자의 변이가 종결코돈을 유발하여 기존 57개 아미노산으로 이루어진 3a 단백질이 46개 아미노산으로 짧아진 것이 확인됨.

9) 타 연구과제 활용

○ 질병관리청 코로나19 유전체 분석 용역과제 수행

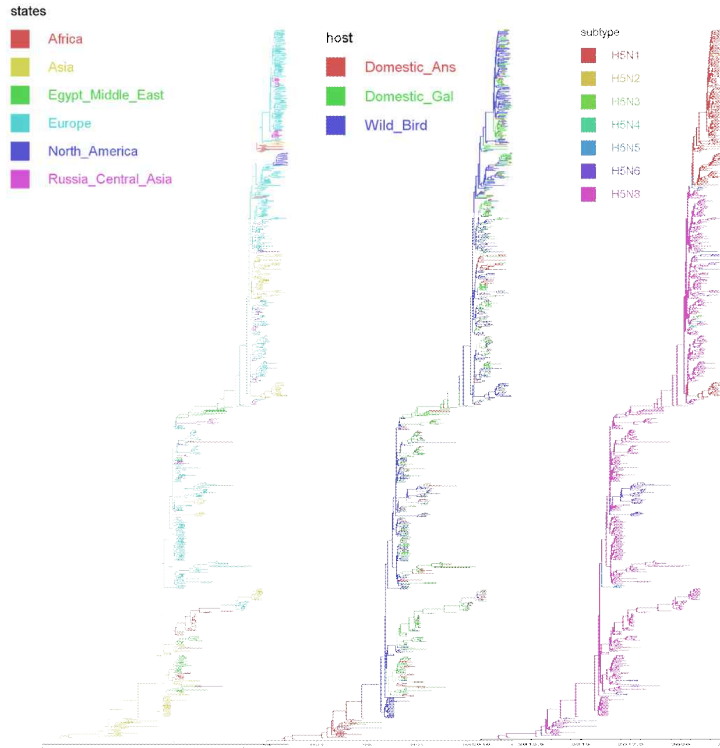
- 본 연구에서 사업화를 하고자 하는 바이러스 시퀀스 phylogeography 분석과 관련하여 질병관리청 용역과제를 수행하고 있음. 현재는 창업 이전으로 경북대학교 산학협력단에서 수행 중.
- 과제명: 국내 발생 코로나19 전장유전체 기반 진화 및 변이 양상 분석
과제 기간: 2022. 03. 15 - 2022. 12. 20
발주처: 질병관리청
수행기관 및 책임자: 경북대학교 산학협력단, 권정훈
- 본 연구과제를 통해 코로나19 전장유전체 이용 phylogeography 분석방법을 구축하였으며, 이를 통해 지속적인 연구 수행 기반이 확립된.
- 연구성과 중 전장유전체 이용 phylogeography 관련 성과는 질병관리청 및 본 연구과제 공동 사사로 현재 Scientific report (IF: 4.99), emerging microbes & infections (IF: 13.2)에 게재됨.



<질병관리청 용역과제 수행 결과 예시>

○ 야생동물질병관리원 조류인플루엔자바이러스 분석 수행

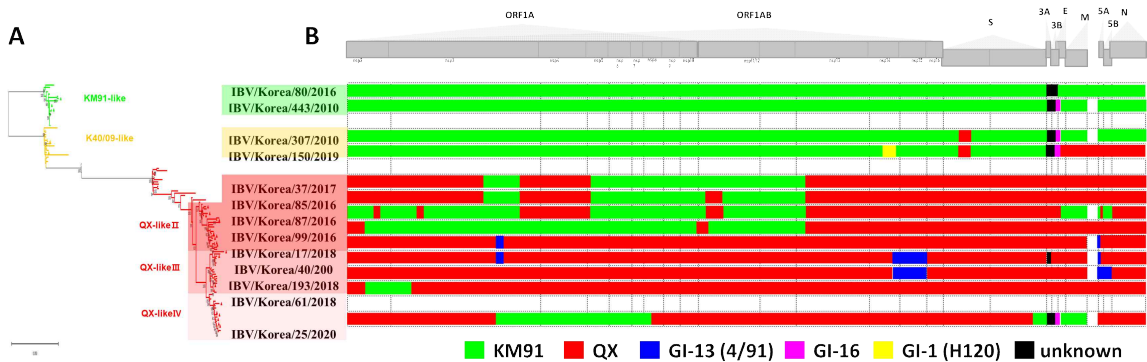
- 본 연구에서 사업화를 하고자 하는 바이러스 시퀀스 phylogeography 분석과 관련하여 야생동물질병관리원으로부터 시험 분석을 의뢰받아 진행하고 있음.
- 분석항목: '21~'22년 동절기 국내 야생조류 분리 고병원성 AI 바이러스
- 본 연구과제를 통해 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 국내·외 전파경로 등을 확인하였음. 해당 결과는 국내 방역 정책 수립을 위한 기초자료로 제공될 예정이며, 현재 Virus evolution (IF: 6.9)에 투고되어 accept 되었음.



<야생동물질병관리원 시험 분석 결과 예시>

○ 농림기획기술식품평가원 타 연구과제 활용

- 본 연구자는 농림축산식품부 타 연구과제인 ‘닭 전염성기관지염 국제 항원뱅크 구축 및 신변종 대비 백신 개발’ 연구과제에 참여하고 있으며, 본 연구과제에서 구축된 NGS 기법을 이용해 닭 전염성 기관지염 바이러스 전장 유전체 분석을 실시함.
- 본 연구과제를 통해 국내 닭 전염성기관지염 바이러스의 재조합 여부를 확인하였고 이전 S1 유전자만을 기반으로 유전형을 결정한 것에 반해 S1 유전자 이외의 부분에서 많은 재조합이 발생하였음을 NGS를 통해 확인하여 Infection genetic and evolution (IF: 3.2)에 게재됨.



<국내 IBV 전장유전체의 재조합 분석 결과 모식도>

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 사업화를 위한 바이러스 NGS 분석 센터 (사명: 바이로진) 창업 완료
 - 조류 코로나바이러스 등 RNA 바이러스 대상 NGS 분석 프로토콜 구축
 - 조류 인플루엔자 바이러스 NGS 분석 프로토콜 구축
 - 아프리카 돼지열병 NGS 분석 프로토콜 구축
 - 몽골 아프리카돼지열병, 조류인플루엔자 등 바이러스 시료 82건 확보 및 분석
 - 베트남 조류인플루엔자 시료 80건 확보 및 분석
 - 브라질 뉴캐슬병, 조류인플루엔자, 전염성기관지염 바이러스 전장 유전체 30건 이상 확보 및 분석
 - 인도네시아 닭 전염성기관지염 바이러스 6건 확보 및 분석
 - 캄보디아 아프리카돼지열병 바이러스 유전자 30건 이상 확보 및 시퀀싱 진행
 - 인도 PRRSV 5건 확보 및 분석
 - 잠비아 아프리카돼지열병 바이러스 49건 유전체 확보 및 분석
 - 이란 가금 및 야생조류 바이러스 시료 92건 확보
 - 국내 조류인플루엔자 바이러스 233건 및 조류코로나 바이러스 34건 전장 유전체 분석
 - 국내 발생 아프리카 돼지열병 바이러스 21건 전장유전체 분석
 - 국내 발생 고병원성 조류인플루엔자 2.3.4.4b 43건 전장유전체 분석
 - HPAI 등 민간 병원체 자원 은행 구축
 - 뉴캐슬병 기반 바이러스 벡터 개발
 - 뉴클레오사이드 이용 바이러스 약독화 기법 개발
-

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

<산업화 성과>

○ 특허출원 (계획 2건 / 실적 2건): 100% 달성

- 1) 뉴클레오사이드 유사체를 이용하여 변이속도가 상승될 수 있음을 본 연구의 NGS 분석 기술을 활용하여 증명하고 이를 활용한 백신 개발 방법에 대한 특허 출원
- 2) 뉴캐슬병 바이러스를 이용하여 신규 벡터를 만들고 이에 대한 특허를 출원함.

출원번호통지서

출원일자 2023.12.19
 특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(23P11030)
 출원번호 10-2023-0186022 (원수번호 1-1-2023-1426274-83)
 (DAS접근코드:980A)
 출원인명칭 경북대학교 산학협력단(2-2004-001684-4)
 대리인성명 특허법률리제(9-2018-100241-6)
 발명자성명 권정훈 이동욱
 발명의명칭 뉴클레오사이드 유사체 이용 바이러스 변이 유도를 통한 역독화 백신 제조 방법

관인생략

출원번호통지서

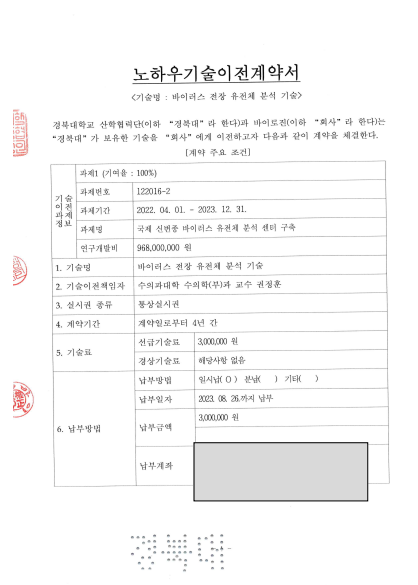
출원일자 2023.12.28
 특기사항 심사청구(우) 공개신청(우) 참조번호(11611)
 출원번호 10-2023-0194792 (원수번호 1-1-2023-1470109-34)
 (DAS접근코드:8978)
 출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
 대리인성명 특허법인 중원(9-2010-100021-9)
 발명자성명 송창진 이말 압달라
 발명의명칭 신규한 재조합 뉴캐슬바이러스벡터 및 이를 포함하는 백신 조성물

특 허 청 장 특 허 청 장

○ 기술이전 (계획 1건 / 실적 1건): 100% 달성

○ 기술료 (계획 0원 / 실적 300만원): 초과 달성

- 바이로진 창업 및 노하우 기술이전 실시



○ 매출액 (계획 종료 전 10 백만원 / 실적 17.325 백만원): 173% 초과달성

<학술 성과>

○ 논문 (계획 종료 전 3건 / 실적 4건): 133% 초과달성

- 코로나19 유전체 분석관련 논문 Scientific reports (IF 4.99)에 게재
- 몽골 아프리카돼지열병 바이러스 전장유전체 분석 논문 Frontiers in Veterinary Science(IF 3.2)에 게재
- 신규 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스의 병원성 실험 결과 Emerging Microbes & Infections (IF 13.2)에 게재
- Klebsiella pneumoniae균 유전체 분석 결과 Frontiers in Veterinary Science(IF 3.2)에 게재
- 종료 후 실적 1건 추가 달성: 조류 인플루엔자 전세계 전파 분석 관련 Virus evolution (IF 6.9)에 게재

○ 교육지도 (계획 4건 / 실적 5건): 125% 초과달성

<p>경북대학교 연구팀의 NGS 분석 교육 실시 (2022. 06. 29 - 06. 30)</p>																				
<p>몽골 연구기관 방문 및 NGS 관련 교육 및 논의 (2022. 06. 21)</p>																				
<p>농림축산검역본부 해외전염병과 NGS 관련 세미나 및 사업화 계획 홍보 (2022. 10. 25)</p>	 <p>개연성보통) 아무런 공포해도 지나치지 않습니다.</p> <p>농림축산검역본부</p> <p>수신 경북대학교공중질(수의과대학장) (장유)</p> <p>제목 해외전염병 지식발전연구회 연차 초청</p> <p>1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.</p> <p>2. 농림축산검역본부에서는 바이러스 및 동물 감염성 질병과 관련하여 아래와 같이 전문가를 모시고 '해외전염병 지식발전연구회' 세미나를 개최하고자 합니다. 귀 기관의 연차가 참석할 수 있도록 협조하여 주시기 바랍니다.</p> <p>가. 연차: 권철훈 교수님(경북대학교 수의과대학)</p> <p>나. 일시: 2022년 10월 25일(목) 14:00-16:00</p> <p>다. 장소: 농림축산검역본부 본관동 3회의실</p> <p>라. 주제: complete genome sequencing of viruses using NGS</p> <p>붙임 외부전문가 초청 세미나 개최 계획(권철훈 교수님) 1부. 끝.</p>																			
<p>2023학년 건국대학교 동물바이러스 역학연구 기법 세미나 진행</p>	 <p>세미나 개최 결과보고서</p> <p>1. 세미나명 • 2023학년 건국대학교 동물바이러스 역학연구 기법 세미나</p> <p>2. 목적 • 인플루엔자와 아프리카돼지열병을 포함한 다양한 동물바이러스 역학 분석 방법에 관한 세미나를 진행하여 참여 연구자의 연구역량 향상을 도모함.</p> <p>3. 진행 내용 • 기간: 2023.01.13. (금) 15:00-17:00 • 장소: 건국대학교 수의과대학 523호 유해선 세미나실 • 일정표</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>일차</th> <th>시간(時)</th> <th>강사</th> <th>강사명</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">23.01.13</td> <td>15:00-15:40</td> <td>Molecular epidemiology of equine influenza</td> <td>이규영</td> </tr> <tr> <td>15:40-16:20</td> <td>Modelling infectious diseases: incase of BVDV and ASFV</td> <td>한준희</td> </tr> <tr> <td></td> <td>16:20-17:00</td> <td>Korean ASFV modeling and epidemiology</td> <td>유대성</td> </tr> <tr> <td></td> <td>17:00-18:00</td> <td>Panel discussion</td> <td>이규영, 한준희, 유대성</td> </tr> </tbody> </table>	일차	시간(時)	강사	강사명	23.01.13	15:00-15:40	Molecular epidemiology of equine influenza	이규영	15:40-16:20	Modelling infectious diseases: incase of BVDV and ASFV	한준희		16:20-17:00	Korean ASFV modeling and epidemiology	유대성		17:00-18:00	Panel discussion	이규영, 한준희, 유대성
일차	시간(時)	강사	강사명																	
23.01.13	15:00-15:40	Molecular epidemiology of equine influenza	이규영																	
	15:40-16:20	Modelling infectious diseases: incase of BVDV and ASFV	한준희																	
	16:20-17:00	Korean ASFV modeling and epidemiology	유대성																	
	17:00-18:00	Panel discussion	이규영, 한준희, 유대성																	
<p>해외 조류인플루엔자 전문가 초청강연: David E. Swayne (전 USDA Southeast Poultry Research Laboratory 기관장, 현 국제 HPAI 컨설팅 회사 운영)</p>	 <p>Global Update on Highly Pathogenic Avian Influenza and Changing Role of Vaccination</p> <p>David E Swayne</p> <p>Private Consultant, Birdflu Veterinarian LLC, Watkinsville, Georgia, USA</p> <p>Former Laboratory Director, Southeast Poultry Research Laboratory, U.S. National Poultry Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Athens, Georgia, USA</p> <p>Disclaimer: This presentation is based on current scientific data and is not an endorsement of any specific product or company</p>																			

○ 타연구과제 활용 (계획 2건 / 실적 4건): 200% 초과달성

- 질병관리청 코로나19 유전체 분석 용역과제 수행 2건
- 농림축산식품부 '닭 전염성기관지염 국제 항원뱅크 구축 및 신변종 대비 백신 개발' 연구 과제 활용
- 본 연구에서 확보된 몽골과의 네트워크를 활용하여 질병청의 "몽골 감염병대응 공조강화 사업 운영" 수행

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허출원	목표(단계별)	2	2	20
		실적(누적)	2	2	
	논문	목표(단계별)	3	3	-
		실적(누적)	4	4	
	논문평균 IF	목표(단계별)	4.3	4.3	10
		실적(누적)	6.15	6.15	
	학술발표	목표(단계별)	3	3	10
		실적(누적)	4	4	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술이전	목표(단계별)	1	1	20
		실적(누적)	1	1	
	기술료	목표(단계별)	0	0	-
		실적(누적)	3,000	3,000	
	매출액	목표(단계별)	10,000	10,000	20
		실적(누적)	17,375	17,375	
	교육지도	목표(단계별)	4	4	10
		실적(누적)	5	5	
	타연구과제 활용	목표(단계별)	2	2	10
		실적(누적)	4	4	
계					100

- * 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- * 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

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

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 Omicron variants in the Republic of Korea	Scientific Reports	이동욱	12(1)	영국	NATURE PORTFOLIO	SCIE	2022-12-27	2045-2322	50
2	Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of African swine fever virus detected in a backyard pig in Mongolia, 2019	Frontiers in Veterinary Science	현지연	10	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023-02-20	2297-1769	100
3	Diverse infectivity, transmissibility, and pathobiology of clade 2.3.4.4 H5Nx highly pathogenic avian influenza viruses in chickens	Emerging Microbes & Infections	권정훈, Kateri Bertran	12(1)	영국	TAYLOR & FRANCIS LTD	SCIE	2023-06-12	2222-1751	100
4	Multidrug-resistant CTX-M-15-positive Klebsiella pneumoniae ST 307 causing bacteremia via gut translocation in a dog	Frontiers in Veterinary Science	현지연	10	스위스	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023-10-26	2297-1769	100
5	Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus in Wild Birds in South Korea during 2021-2022: Changes in Viral Epidemic Patterns	Virus Evolution	김지윤	10	영국	OXFORD UNIV PRESS	SCIE	2024-02-07	2057-1577	50

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022년 대한수의학회 추계국제학술대회	이동욱	2022-11-17	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	2022년 대한수의학회 추계국제학술대회	현지연	2022-11-17	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	2023 대한바이러스학회 연구회연합 정기학술대회	이동욱	2023-08-24	양양 을지인력개발원	대한민국
4	The Ninth ESWI Influenza Conference	이동욱	2023-09-17	Valencia, 스페인	스페인

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	뉴클레오사이드 유사체 이용 바이러스 변이 유도를 통한 약독화 백신 제조 방법	대한민국	경북대학 교 산학협력 단	2023.12 .19	10-2023 -018602 2				100	미활용	
2	신규한 재조합 뉴캐슬바이러스백터 및 이를 포함하는 백신 조성물	대한민국	건국대학 교 산학협력 단	2023.12 .28	10-2023 -019479 2				100	미활용	

○ 지식재산권 활용 유형

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

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									
2	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

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

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

[경제적 성과]

시제품 제작

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

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	바이러스 전장 유전체 분석 기술	바이로진	2023-07-27	3 백만원	

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

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

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시 (창업)	창업	국내	바이러스 유전체 분석	바이러스 유전체 분석	바이로 진	17,325		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)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
바이러스 유전체 분석	2023	17,325		17,325	세금계산서
합계		17,325		17,325	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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

□ 고용 창출

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

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

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

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

○ 교육지도 (계획 4건 / 실적 5건): 125% 초과달성

- 경북대학교 연구팀의 NGS 분석 교육 실시 (2022. 06. 29 - 06. 30)
- 몽골 연구기관 방문 및 NGS 관련 교육 및 논의 (2022. 06. 21)
- 농림축산검역본부 해외전염병과 NGS 관련 세미나 및 사업화 계획 홍보 (2022. 10. 25)
- 2023학년 건국대학교 동물바이러스 역학연구 기법 세미나 진행
- 해외 조류인플루엔자 전문가 초청강연: David E. Swayne (전 USDA Southeast Poultry Research Laboratory 기관장, 현 국제 HPAI 컨설팅 회사 운영)

○ 타연구과제 활용 (계획 2건 / 실적 4건): 133% 초과달성

- 질병관리청 코로나19 유전체 분석 용역과제 수행 2건
- 농림축산식품부 '닭 전염성기관지염 국제 항원뱅크 구축 및 신변종 대비 백신 개발' 연구과제 활용
- 본 연구에서 확보된 몽골과의 네트워크를 활용하여 질병청의 "몽골 감염병대응 공조강화사업 운영" 수행

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

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

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

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
기탁	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<정량성과>		
○ 사업화 (창업)	○ 바이로진 창업, 노하우 기술이전	○ 100%
○ 매출액 10백만원	○ 매출액 17.325 백만원	○ 173%
○ 특허출원 2건	○ 특허출원 2건	○ 100%
○ SCI 논문게재 3건	○ SCI 논문게재 4건	○ 133%
○ SCI 논문 평균 IF 4.3	○ SCI 논문 평균 IF 6.15	○ 143%
○ 학술발표 3건	○ 학술발표 4건	○ 133%
○ 교육지도 4건	○ 교육지도 5건	○ 125%
○ 타연구과제 활용 2건	○ 타연구과제 활용 4건	○ 200%
○ 국제 네트워크 및 기술 공유 체계 구축	○ 몽골, 베트남, 브라질, 인도네시아, 캄보디아, 인도, 잠비아, 이란 등 연구 네트워크 구축 및 시료 공유	○ 100%
○ NGS 활용 염기서열 분석 기술 개발 및 표준화	○ AI, ASF 및 미확인 병원체 대상 NGS 프로토콜 구축	○ 100%
○ 유전체 빅데이터 기반 분자역학 연구	○ AI, ASF, IBV 등 다수의 병원체에 대한 분자역학 연구 수행	○ 100%
○ 유전체 빅데이터 기반 clade 2.3.4.4 조류 인플루엔자 진단법 특허 출원	○ clade 2.3.4.4 대상 H5 유전자 타겟 real-time PCR 시스템 2건 제작 ○ 특허출원 보류	○ 90%
○ 유전체 빅데이터 기반 clade 2.3.4.4 조류 인플루엔자 백신후보주 선정 및 특허 출원	○ 뉴캐슬병 벡터 개발 - 특허출원 ○ 신규 바이러스 약독화 기법 개발 - 특허출원	○ 150%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- clade 2.3.4.4 조류 인플루엔자 대상 진단법 제작 및 해외 군주 활용 평가를 진행하였으나, 미국 USDA에서 공개한 프로토콜 대비 개선 정도가 적어 특허 출원 및 사업화를 보류함.

2) 자체 보완활동

- 연구 수행 중 신규 약독화 백신 개발 관련 기술을 개발하여 관련 특허를 출원하여 정량 성과를 보완함.
- 최근 유행주 대상 real-time PCR 진단 시스템을 다시 구축 중임.

3) 연구개발 과정의 성실성

- 기존 계획한 정량 성과를 100% 이상 초과 달성함.
 - 국제 네트워크 구축을 위해 몽골, 베트남, 브라질, 인도네시아, 캄보디아, 인도, 잠비아, 이란 등 다양한 국가와 연구교류를 실시하고 다수의 시료를 공유하는 등 국제 네트워크 교류를 위해 최선을 다함.
 - 경북대학교의 교원창업 제도를 활용하여 창업을 실시하고 직접 사업화를 진행해 목표 매출액을 달성 하는 등 사업화에 최선을 다함.
 - 개발된 진단기술의 평가를 위해 미국 USDA의 시료를 활용하는 등 최선을 다하였으나, 미국 USDA에서 공개한 진단기술 대비 개선도가 적어 특허 출원을 보류함.
 - 신규 백신개발을 위해 기존에 목표하였던 뉴캐슬병 벡터 개발을 성실히 완료함.
 - 연구수행 중 NGS 활용 전장 유전체 분석을 통해 바이러스 변이 정도를 확인하였고, 코로나바이러스의 약독화를 위해 변이 속도 상승 방안을 고안하여 특허를 출원하는 등 기존 계획 대비 추가 연구 성과를 달성함.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- **동물 질병 관련 국제 네트워크 구축**
 - AI, ASF 등 동물 질병 관련 여러 국가와 국제 네트워크를 구축하여 향후 질병 발생에 대한 상호 협조 및 공동연구 기반을 마련함.
 - **역학 기술 고도화 및 방역 효율 증대**
 - 본 연구과제를 통해 확보된 유전체 빅데이터 및 분석기술은 국내 역학조사 기술의 고도화 및 선진화에 기여할 것으로 기대됨.
 - 고도화된 역학 기술은 향후 질병 발생 시 방역효율을 증대에 기여할 것으로 기대됨.
 - **동물 바이러스 유전체 분석 기술 대중화**
 - 동물 바이러스 유전체 분석 서비스를 제공하는 기업을 창업하여 누구나 바이러스 유전체 분석 연구를 수행할 수 있도록 함.
 - **동물 바이러스 유전체 빅데이터 선점**
 - 바이러스 유전체 빅데이터 확보를 통해 향후 신변종 병원체 관련 데이터 과학 연구 분야 기술 우위를 선점할 수 있을 것으로 기대됨.
 - **코로나19, AI등 대규모 발생 시 민간 기술 지원 인프라 구축**
 - 단기간 집중 대규모 발생으로 정부기관의 유전체 분석 및 역학조사 인프라 부족 시 이를 보완할 수 있는 신속대응 민간 전문 연구센터가 될 것으로 기대됨.
 - **국산 백신 및 진단기술 고도화 및 세계시장 진출**
 - 해외 수출이 가능한 빅데이터 기반 광범위 진단기술 및 백신은 국가 경쟁력 제고 및 경제적 가치 창출에 기여할 것으로 기대됨.
 - 특히 본 연구에서 개발된 뉴클레오사이드 유사체 이용 변이 유도 기술은 기존에 시도되지 않았던 기술로 국내 백신 개발 및 수출에 기여할 것으로 기대됨.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- **신변종 바이러스 유전체 분석 센터 지속 운영**
 - 본 연구과제를 통해 설립된 유전체 분석 센터 및 확립된 protocol은 향후 지속적인 국내외 바이러스 유전체 빅데이터 생산에 기여할 예정임.
 - 유전체 분석센터의 분석 서비스를 통해 지속적인 경제 가치 창출이 가능할 것으로 기대됨.
 - **신변종 바이러스 분자 역학 연구**
 - 본 연구과제를 통해 확보된 유전체 빅데이터 및 분석기술은 향후 발생하는 다양한 질병 역학 연구에 활용될 것으로 기대됨.
 - **학술 성과 도출**
 - 다양한 바이러스 분자역학 연구결과는 SCI 논문 발표를 통해 국내외 연구자들에게 질병 제어에 필요한 정보를 제공하고, 다수의 학술 성과를 지속적으로 도출할 것으로 기대됨.
 - **타연구 및 정책 활용**
 - 유전체 빅데이터 구축은 현재 급속도로 발전 중인 데이터 분석 과학과 접목되어 질병 발생 예측 등 다양한 연구 분야에 활용될 것으로 기대됨.
 - 유전체 기반 분자역학 연구 결과는 향후 국가 질병 제어 정책 수립에 핵심적인 기반 지식을 제공해줄 것으로 기대됨.
 - **백신 개발 및 사업화**
 - 본 연구를 통해 개발된 뉴캐슬병 벡터 및 약독화 기술은 다양한 바이러스에 적용할 수 있는 기술로 다양한 백신 개발 및 사업화에 활용될 수 있을 것으로 기대됨.
 - 본 연구를 통해 개발된 신규 신속 바이러스 약독화 기술은 새로운 유행주에 맞춤형으로 대응 가능한 신속 감염병 대응 백신 플랫폼으로 활용 가능할 것으로 기대됨.
 - 맞춤형 백신 개발 전략은 향후 동남아 국가를 상대로 맞춤형 백신 제작 및 수출에 활용될 수 있을 것으로 기대됨.
 - **진단기술 개발 활용**
 - 본 연구과제에서 확보된 바이러스 유전체 빅데이터 및 바이러스를 활용하여 향후 진단 기술 개발 및 민감도 상승 평가 연구에 활용하고자 함.
 - 본 연구과제에서 개발된 H5형 고병원성 조류 인플루엔자 대상 real-time PCR 기술은 과제 종료 이후에도 지속적으로 수정 보완하여 최적화 완료 후 현장에서 사용 가능하도록 시퀀스 정보 등을 공개 하고자 함.
-

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	3	
	비SCIE		
	계	3	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	매출액	40 백만원	
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서

주 의

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