

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

발간등록번호

11-1543000-004669-01

신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사

2024.08.06

주관연구기관 / 한국축산데이터 주식회사

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사”(개발기간 : 2022.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.08.06.

주관연구기관명 : 한국축산데이터 주식회사 (대표자) 경 노 겸 (인)

주관연구책임자 : 강 정 원 (인)

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

최종보고서							보안등급				
							일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]				
중앙행정기관명		농림 축산식품부			사업명		사업명		가축질병대응기술고도화사업		
전문기관명 (해당 시 작성)					내역사업명 (해당 시 작성)		내역사업명		국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축		
공고번호		2022-99			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		122061-2		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710 동물질병예방	40%	LA0701 수의 전염병	30%	LB0704 수의미생물/기생생물	30%				
	농림식품과학기술분류	RB0201 동물질병관리	40%	RB0203 수의공중보건	30%	RB0104 수의미생물/기생생물	30%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사							
		영문		Epidemiological study and molecular characterization of pathogens causing bovine respiratory disease complex including newly emerging Influenza D virus							
주관연구개발기관		기관명		한국축산데이터 주식회사		사업자등록번호		872-88-00873			
		주소		(34138) 대전광역시 유성구 대학로 157, 201호(궁동)		법인등록번호		164711-0072344			
연구책임자		성명		강정원		직위		CTO			
		연락처		직장전화 02-6956-1120		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2022. 04. 08 - 2023 .12. 31(1년 9개월)							
		1단계		2022. 04. 08 - 2023 .12. 31(1년 9개월)							
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발비 외 지원금
		현금		현금 현물		지방자치단체 기타()		현금 현물 합계			
총계		600,000		8,580 141,520				608,580 141,520 750,100			
1단계	1년차	257,142		0 64,300				257,142 64,300 321,442			
	n년차	342,858		8,580 77,220				351,438 77,220 428,658			
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		공동연구개발기관								비고	
		위탁연구개발기관								역할	
		연구개발기관 외 기관								기관유형	
연구개발담당자 실무담당자		성명		이*정		직위					
		연락처		직장전화 02-6956-1095		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호					

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

2024 년 05 월 30 일

연구책임자: 강 정 원 (인)

주관연구개발기관의 장: 경 노 겸 (직인)

공동연구개발기관의 장: (직인)

위탁연구개발기관의 장: (직인)

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	가축질병대응기술고도화사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축			연구개발과제번호			122061-2
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0710 동물질병예방	40%	A0701 수의 전염병	30%	LB0704 수의미생물/기생생물	30%
	농림식품 과학기술분류	RB0201 동물질병관리	40%	RB0203 수의공중보건	30%	RB0104 수의미생물/기생생물	30%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사						
전체 연구개발기간	2022.04.01. - 2023.12.31						
총 연구개발비	총 778,600 천원 (정부지원연구개발비:600,000천원, 기관부담연구개발비 :178,600천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[v] 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"> ■ 소에서 Influenza D virus 역학조사 및 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 인도/한국에서의 소 Influenza D virus 발병 조사 ▪ 소의 nasal swab 및 혈액에서의 Influenza D virus의 분자 진단법 확립 ▪ 바이러스의 유전체학적 분석 및 계통발생학적 분석 비교 ■ 소 호흡기 발병 바이러스 역학조사 및 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 인도/한국에서의 소 호흡기 질병 원인체 발병 조사(BRSV, PI-3, IBR, BVDV 등) ▪ 소의 nasal swab 및 혈액에서의 호흡기 원인체 Multiplex real-time PCR 분자진단법 확립 ▪ 국내 호흡기 관련 바이러스 분리 및 동정 ▪ 유전체학적 분석 및 계통발생학적 분석 비교 				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ■ 소 샘플링을 위한 인도/한국의 농장 섭외 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 총합 10~12개 정도의 농장 섭외 ▪ 인도의 버팔로/젓소, 한국의 한우/젓소를 고려하여 농장 섭외 ▪ 인도의 경우, Rajasthan주, Uttar pradesh주를 포함하여 농가 선정 완료 및 추가 선정 예정 ▪ 한국의 경우, 지역과 축종을 고려하여 농가 선정 예정 ▪ 인도 샘플링의 경우, 현지 연구기관 및 수의사의 도움을 받아 수행 예정 ▪ 소 농장의 나라별/축종별/연령별/지역별/사육규모/환경온도 등 기록 ▪ 한국과 인도 포함하여 도합 500마리 이상의 시험우 확보 및 정기적인 샘플링 ■ Nasal Swab 및 병원체 검사 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 소의 비강스왑 혹은 비강추출물 채취 및 호흡기 관련 이상 				

증상 기록(BCS, 체온, 지속적인 기침, 콧물, 활력저하, 식욕감소, 눈곱 등)

- 정상/비정상 소의 긴 double-guarded culture swab봉을 이용하여 Nasal swab을 진행
- Swab sample의 Sample stabilizer에 보관 및 실험실로 이동

■ 송아지 호흡기 병원체 역학조사

- 실험 샘플의 핵산 추출(한국/인도) 후, 한국축산데이터(주) 실험실로 송부
- Pubmed 및 Genbank를 이용하여 유전자 서열 검색 및 primer-probe design을 통한 각각의 병원체(BVDV, BRSV, PI-3, IBR, Influenza D virus 등)에 대한 PCR 및 real-time PCR 실험법 셋팅
- 다양한 소 호흡기 병원체를 한번에 조사할 수 있는 multiplex real-time PCR법 셋팅
- 한국 축산데이터에서 핵산 및 real-time PCR을 이용한 소 호흡기 질병 원인체 발병 조사(BVDV, BRSV, PI-3, IBR, Influenza D virus 등)
- (한국) Swab 샘플의 세포배양 & 바이러스 배양 시스템을 이용한 바이러스 분리 및 동정
- 바이러스 분리 동정을 통한 whole-genome sequencing 진행

■ 유전자 분석 및 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 빅데이터를 통한 병원체군 조사

- 주요 바이러스들의 대표서열 (reference sequence) 들을 포함한 이미 알려진 서열 (sequence) 정보를 public database로부터 다운로드
- Next generation sequencing (NGS) 장비를 이용하여 raw read data 및 새로운 바이러스의 서열 확보구축된 데이터베이스의 서열들과 새로운 서열들을 이용한 상동성 분석 (pairwise sequence comparison)과 계통 분석 (phylogenetic analysis)을 통해 새로운 바이러스와 기존의 바이러스들과의 identity 확인, origin 유추 및 어떤 속 (genus) 또는 목 (family)에 속하는지 확인
- 기존에 알려진 서열 정보 및 포지션 정보를 바탕으로 open reading frame (ORF), motif 등을 찾아 새로운 바이러스 서열 annotation
- 데이터베이스 내에서, 새롭게 얻어진 바이러스 서열과 가장 유사한 (가장 높은 identity를 갖는) 대표 서열 (reference sequence) 선택
- 선택된 대표 서열을 기준으로 raw read들을 mapping 하여 변이 (variant)들이 존재하는지 확인
- Annotation 결과를 바탕으로, 발견된 variant들의 위치 및 기존 바이러스들과의 차이 확인
- 새롭게 구축한 데이터베이스를 기반으로, 신종 바이러스 서열이 상동성 분석, 계통 분석, 변이분석 과정을 통해 다양한 변이들을 빠르게 찾을 수 있는 파이프라인 구축
- 나라별/축종별/연령별/지역별에 따라 유전자 서열 분석 진행
- 계통발생학적 분석을 통한 나라별/축종별/연령별/지역별 유전자 서열 비교
- Raw data를 이용하여 군집분석 통해 병원체 군체 비율 상관성 조사

	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 소 호흡기 병원체 조사를 위한 인도 현지 네트워크 구축 ▪ 소 소화기 병원체 조사를 위한 추가 인도 네트워크 구축 ▪ 소 호흡기 병원체 진단용 multiplex real time PCR 진단법 수립 ▪ 한국 인도 소 호흡기 병원체 역학조사 및 유전자 분석 ▪ 한국 소 설사 병원체 역학조사 ▪ NGS를 이용한 국내 소 호흡기 및 소 설사 관련 neglected 바이러스 검출 ▪ 국내 미보고 소 호흡기 바이러스 2종에 대한 현황 연구 수행 (BRAV 및 BRBV) ▪ 국내 미보고 소 설사 바이러스 2종에 대한 현황 연구 수행 (CsPV1 및 BooV) ▪ 논문 1편, 특허출원 2건, 학술대회 발표 4건 ▪ 기술 실시 1건
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>1) 연구개발성과의 활용방안</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 인도와의 국제협력을 통한 감염병 예찰 시스템 확립 <ul style="list-style-type: none"> • 인도와의 지속적인 교류를 통해 추후 추가적인 소 관련 질병 연구의 예찰 자료 확보에 활용 • 가축질병 조기대응을 위한 인도·한국 연구샘플을 이용한 국제 수준의 진단법 확립에 활용 ■ 원헬스 질병 예방 <ul style="list-style-type: none"> • 인도 소에서 <i>C. parvum</i>과 같은 인수공통 질환 원인체의 바이러스가 소 설사의 원인체로 검출될 경우 소 산업과 관련된 사람들에게 노출 가능성이 있으므로 공중보건학 및 원헬스적 관점에서 주요한 발견이 될 것임 <p>2) 연구개발성과의 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 국내에 보유 중인 신기술·신사업 수출 기대 가능성 <ul style="list-style-type: none"> • 인도의 경우, 전세계적으로 가장 많은 수의 소 사육두수를 가지고 있기 때문에 본 사업을 통해 소 관련 사업 수출에 있어 충분한 기반을 될 것으로 판단됨 • 현재 본 사에서는 인도와의 사업을 통해 본사 보유중인 ICT 기술 및 기타 소 관리에 대한 전반적인 노하우·신기술 수출을 준비중에 있으며, 본 사업을 통해 추가적인 국내 다른 기관의 기술도 전파 가능할 것으로 기대 ■ 국내 소 질병 연구에 대한 기반 마련 가능성 제공 <ul style="list-style-type: none"> • 국내에서는 소 질병연구가 다른 가축 축종들에 비해 상대적으로 빈약하게 연구되고 있음 • 국내 소 연구질병은 주로 가시적으로 피해가 나타나는 송아지 설사증이나 구제역 등의 국가적 질병에 대해서만 연구가 진행되고 있지만, 실제 농가에 비가시적으로 피해를 주고 있는 호흡기질병이나 번식질병 등에 대해서는 관심이 소홀한게 현실임 • 본 연구를 통해 다시 소 질병에 대한 관심이 증가될 것으로 기대됨 ■ 기타 축종 관리 시스템 구축 기반 마련 <ul style="list-style-type: none"> • 주력 가축(소)에서 관리 시스템을 도입함으로써 경제적 효과를 확인하게 되면 비주류 가축(닭, 오리 등)에 대한 관리 시스템의 수요도 증가할 것으로 판단됨 • 일부 가축의 전염병에 대한 관리 뿐 아니라 전체 산업동물에 대한 관리가 유지된다면 농가의 소득에 영향을 미치는 요인 중에서 전염병 관리에 드
---------------------------	---

	는 비용(의약품비, 사료비 등)이 획기적으로 줄어들 것을 기대할 수 있음											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	1	2										
	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	소 호흡기 질병		신종 인플루엔자 D 바이러스		원인체 진단		계통발생분석		차세대 염기서열분석			
영문핵심어 (5개 이내)	Bovine Respiratory Diseases		Novel influenza D virus		Pathogen Diagnosis		Phylogenetic analysis		Next Generation Sequencing(NGS)			

< 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

가. 연구배경

- 1) 소의 호흡기 질병은 밀집사육, 다두 집단 사육에 따른 스트레스와 환절기의 낮과 밤의 큰 일교차와 이런 일교차를 막기 위해 외부공기의 유입차단으로 밀폐된 우사내에 암모니아가스와 탄산가스, 먼지 등에 의한 호흡기계점막의 손상으로 기본 면역체계가 약화되어 항병력이 떨어지게 되고, 또 여기에 세균 또는 바이러스가 복합감염되어 호흡기 질병이 발생하게 됨. 국내 및 해외에서의 발생율은 약 20%, 치사율은 약 2~3% 정도로 보고되고 있음.
- 2) 소의 호흡기 질병 발생은 생산성 저하, 폐사, 치료비용, 도축 당시의 일부 농 부위 제거 등의 결과로 경제적 피해를 일으키게 됨. 질병 발생에 따른 피해금액은 기존 연구에 의하면 마리당 폐사의 경우 폐사당 AUD\$ 1,647.53 (약 150만원), 3번 이상의 치료를 받은 소의 경우, 도축에서 AUD\$ 384.97 (약 34만원), 임상증상이 있었던 소에서 AUD\$ 213.90 (약 19만원), 준임상형 호흡기 질병의 경우, AUD\$ 67.10(약 6만원)의 손해가 발생하였음 (Claudia 등, 2020).
- 3) 호흡기질병을 일으키는 원인체는 주로 바이러스이며, **소 바이러스성 설사병 바이러스 (BVDV), 소 전염성비기관염(infectious bovine rhinotracheitis, IBR), 소 파라인플루엔자증(bovine parainfluenza virus type 3, PI-3), 소 합포체성 폐렴(Bovine respiratory syncytial virus, BRSV)** 등이 알려져 있음(Grissett 등, 2015).
- 4) 특히 2011년도에 미국에서 처음으로 보고된 **Influenza D virus**의 경우, **소를 natural host로 하기 때문에** 소에서 증폭되어 돼지, 닭, 염소를 포함한 가축뿐만 아니라 사람까지 전파가 가능한 것으로 알려져 있음(Liu 등, 2020, 그림 1). 현재까지 미국, 프랑스, 이탈리아, 아일랜드, 중국과 일본에서 사육되고 있는 소와 돼지에서 총 65개의 HEF 유전자 검출 및 특성이 보고되었으며, **유라시아 대륙에 만연해** 있을 것으로 추측 됨.

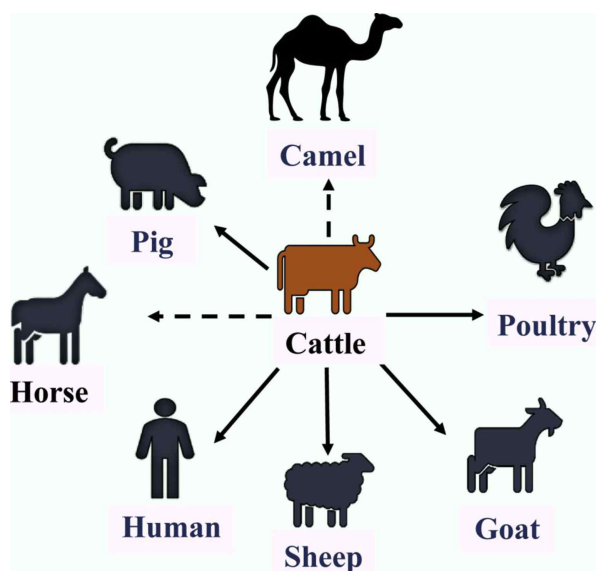


그림 1. Influenza D virus의 숙주범위 및 생리(Liu 등, 2020). 소를 자연숙주로 하여 다른 동물로 증폭되며, 지금까지 사람, 양, 염소, 닭, 돼지에는 항원이 검출되었고, 낙타, 말에서는 항체가 검출되었음.

- 5) 전세계적으로 2021년도 소 사육두수는 약 10억 마리며, 인도에서 사육중인 사육두수

는 305.5백만마리, 전 세계 사육두수의 30.52%를 차지하고 있음(그림 2). 즉, 전 세계적으로 소가 인도에서 가장 많이 사육되고 있으며, 그 뒤로 브라질과 중국, 미국 순으로 이루어져 있기 때문에 소 질병 조사에 있어서 인도를 포함하는 것은 공중보건학적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있음.

Ranking Of Countries With The Most Cattle			
World		1,000,967,000	
Rank	Country	2021	% Of World
1	India	305,500,000	30.52%
2	Brazil	252,700,000	25.25%
3	China	95,620,000	9.55%
4	United States	93,595,000	9.35%
5	European Union	85,545,000	8.55%
6	Argentina	53,831,000	5.38%
7	Australia	23,217,000	2.32%
8	Russia	17,953,000	1.79%
9	Mexico	17,000,000	1.70%
10	Uruguay	11,946,000	1.19%
11	Canada	11,150,000	1.11%
12	New Zealand	10,063,000	1.01%
13	Egypt	7,850,000	0.78%
14	Belarus	4,300,000	0.43%
15	Japan	3,922,000	0.39%
16	Korea, South	3,774,000	0.38%
17	Ukraine	3,001,000	0.30%

Source: FAS/USDA (head)

그림 2. 2021년도 나라별 소 사육두수. 전 세계 중 인도가 가장 많은 수의 소 사육두수를 차지하고 있으며, 그 뒤로 브라질과 중국이 뒤따르고 있음.

7) 현재까지의 국내 연구동향을 살펴보면 송아지 시기에 폐사까지 나타나는 소화기 질병에 대해서는 주로 송아지의 소화기 질병의 원인체의 특성에 대한 연구는 진행되고 있는 반면, 소화기에 비해 증상이 약한 호흡기 원인체에 대해서는 연구가 거의 보고되고 있지 않음. 또한 소를 자연숙주로 해서 증폭하는 신종 바이러스인 Influenza D virus에 대해서는 현재까지 보고된 바 없음. 인도 역시, 소의 질병들인 구제역(Foot and Mouth Disease, FMD), 소의 럼피스킨병(Lumpy skin disease) 등에 대해서는 보고되고 있지만 상대적으로 호흡기나 소화기 질병에 대한 연구결과 보고는 많이 미흡함. 인도 역시 신종 바이러스인 Influenza D virus에 대해서는 현재까지 보고된 바 없음.

8) 따라서 본 연구에서는 인도와 한국 소에서 소 산업의 심한 경제적 피해를 일으키고 있는 호흡기 질병에 대한 조사를 진행하고자 함. 특히 특히, 신종 바이러스인 Influenza D virus를 포함한 BVDV, IBR, PI-3 등 호흡기 병원체의 진단법을 확립하고 유전적인 특성을 분석하여 국내와 인도 뿐만 아니라 전세계적인 소의 건강과 복지에 기여하고자 함.

나. 국내 · 외 연구현황

1) 국내 소에서 호흡기 질병을 일으킨다고 알려져 있는 일부 병원체들의 특성 조사는 진행되고 있지만, 호흡기 임상증상과 연관된 원인체 조사는 거의 보고되고 있지 않음.

- 2) 호흡기를 일으키는 것으로 알려져 있는 **BRSV**의 경우, 1988년 박 등에 의해 향원의 감염 여부등의 보고되었고, 그후 2000년도에 이 등에 의해 전남지역에서 혈청학적인 역학조사가 진행되었음. 그 후, 2019년도에 국내 5개 지역에서 조사를 진행하였으나, 보고되지 않았음.
- 3) 그 외 PI-3나 IBR 역시 국내에서는 거의 보고되지 않음. 1988년도 김 등, 2014년 최 등에 의해서 **IBR**의 역학조사 결과가 보고되었고, **PI-3** 역시 2013년도 엄 등에 의해 보고된 것 말고는 연구보고가 거의 진행되지 않음.
- 4) **BVDV**의 경우, 호흡기가 아닌 주로 소화기와 연관되어서 보고되고 있음. 다른 소 호흡기 유발 바이러스에 비해 BVDV-1, BVDV-2 등의 국내 역학 조사보고가 지속적으로 진행되고 있음(성 등, 2013; 양 등 2007; 한 등, 2018). 뿐만 아니라 BVDV의 바이러스의 복제특징 등 바이러스 자체에 대한 연구도 일부 진행되고 있음(차 등, 2013).
- 5) 인도의 경우, 국내보단 조금 더 활발하게 소 호흡기 질병 원인체에 대한 연구가 진행되고 있음. BRSV, PI-3의 분자생물학적 특성 조사(Kamdi 등, 2020), BVDV 및 HoBi-like pestivirus의 특성조사 (Hoppe 등, 2019), 소와 양에서의 BVDV 특성 조사 (Mishra 등 2012; Mishra 등 2014) 등 원인체에 대한 연구가 보고되고 있음. 뿐만 아니라 산화 스트레스와 혈청 미네랄, 호흡기질병과의 상관관계 조사(Joshi 등, 2018), 호흡기질병을 일으키는 원인체에 대한 항생물질 연구(Rajamanickam 등 2019) 등 질병의 치료나 질병의 증상과 관련된 연구도 보고되고 있음.
- 6) 소의 호흡기 질병에 대해서는 전 세계적으로 연구가 과거부터 지속적으로 활발히 진행되고 있음. 원인체 특성 뿐만 아니라 유전적인 요인(Ellis, 2001), 통제방법 (Edwards, 2010), 방어와 선천면역(Ackermann 등, 2010), 임상학적 진단법 (Buczinski 등, 2020) 등 국내와는 소화기보다 호흡기 질병에 좀 더 많은 연구가 투자되고 있음.
- 7) Influenza D virus의 경우, 2011년도에 미국 오클라호마에서 돼지로부터 처음 보고되었지만, 추후 결과에서 돼지보다 소에 더 만연해있으며 소가 자연숙주로서 역할을 하게 된다고 보고됨(Hause 등, 2013; Hause 등, 2014). 그 후 다양한 숙주(말, 돼지, 닭, 염소, 사람 등)에서 보고되었으며, 크게 2개의 lineage[D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK) and D/bovine/Oklahoma/660/2013 (D/660)]로 나누어져있었지만, 최근에 일본에서 2개의 새로운 genetic lineage가 보고됨(Collin 등, 2015; Murakami 등, 2020, 그림 3).

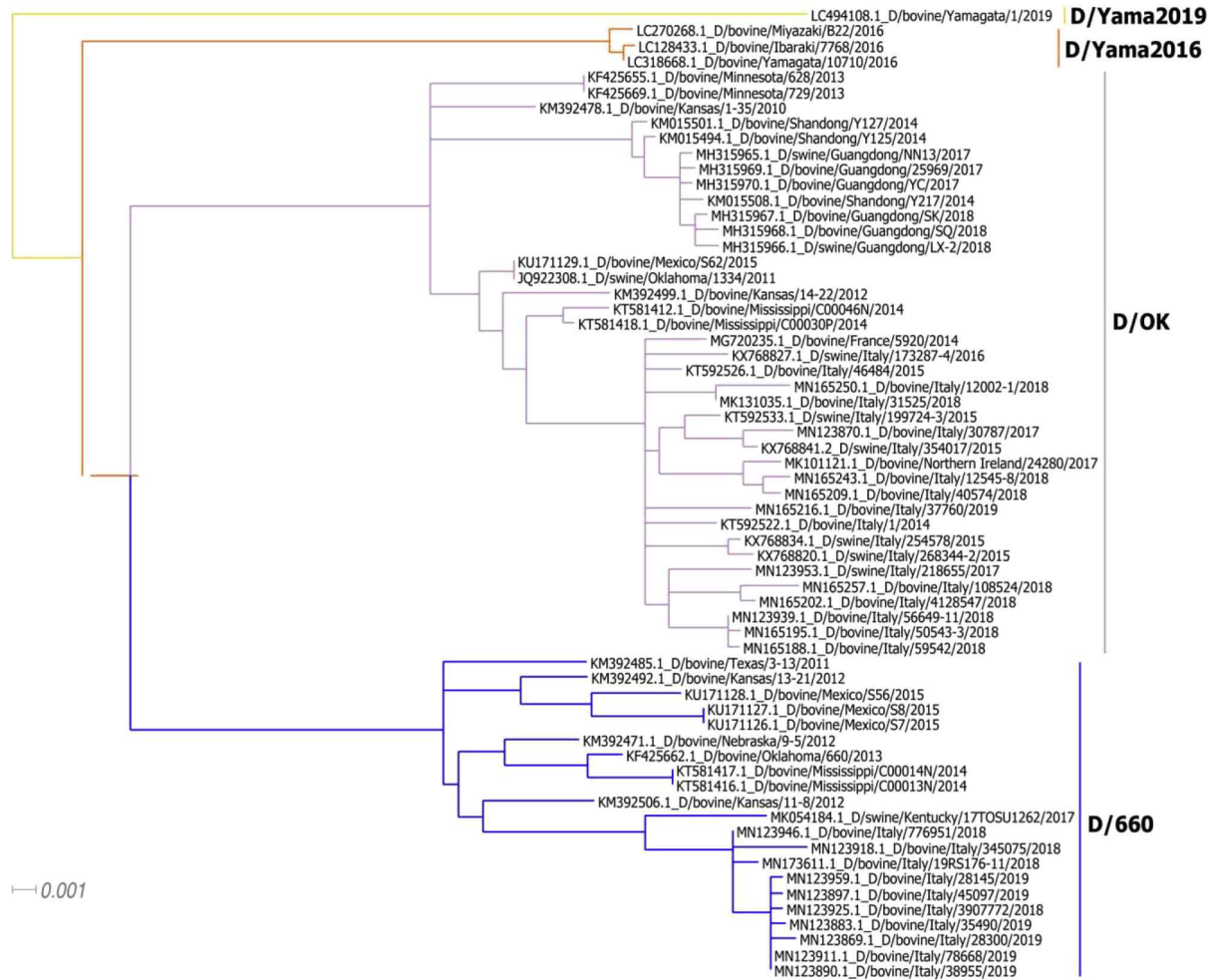


그림 3. Influenza D virus의 Hemagglutinin-esterase (HEF) 분절을 이용한 계통분석 트리 결과(Liu 등, 2020). Maximum-likelihood 방법을 이용하였으며, Genbank에 등록된 65개의 Full HEF 뉴클레오타이드 서열을 분석하였음.

7) 문헌조사 결과로 볼 때, Influenza D virus가 **인접한 국가들에서도 보고**되고 있는 바, 인도와 한국에서도 Influenza D virus가 발견될 가능성이 매우 높음. 역학 조사 및 유전자 분석을 통해 추후 **예방전략 및 백신개발을 위한 기초단계**로서 본 연구가 꼭 필요하다고 생각됨.

다. 연구개발과제의 목표 및 내용

1) 연구개발과제의 최종 목표

- 소에서 Influenza D virus 역학조사 및 유전자 분석
 - 인도/한국에서의 소 Influenza D virus 발병 조사
 - 소의 nasal swab 및 혈액에서의 Influenza D virus의 분자진단법 확립
 - 바이러스의 유전체학적 분석 및 계통발생학적 분석 비교
- 소 호흡기 발병 바이러스 역학조사 및 유전자 분석
 - 인도/한국에서의 소 호흡기 질병 원인체 발병 조사(BRSV, PI-3, IBR, BVDV 등)
 - 소의 nasal swab 및 혈액에서의 호흡기 원인체 Multiplex real-time PCR 분자진단법 확립
 - 국내 호흡기 관련 바이러스 분리 및 동정
 - 유전체학적 분석 및 계통발생학적 분석 비교

2) 연구개발과제의 내용

- 소 샘플링을 위한 인도/한국의 농장 섭외
 - 총합 10~12개 정도의 농장 섭외
 - 인도의 버팔로/젓소, 한국의 한우/젓소를 고려하여 농장 섭외
 - 한국의 경우, 지역과 축종을 고려하여 농가 선정 예정
 - 인도 샘플링의 경우, Indian Agricultural Research Institute (ICAR) 소속 수의사들의 농장 섭외 진행
 - 한국과 인도 포함하여 **도합 500마리 이상**의 시험우 확보 및 정기적인 샘플링

- Nasal Swab 및 병원체 검사

- 소 농장의 나라별/축종별/연령별/지역별/사육규모/환경온도 등 기록
- 소의 비강스왑 혹은 비강추출물 채취 및 호흡기 관련 이상증상 기록(BCS, 체온, 지속적인 기침, 콧물, 활력저하, 식욕감소, 눈꼽 등)
- 정상/비정상 소의 긴 double-guarded culture swab봉을 이용하여 Nasal swab을 진행(그림 4)
- 인도 샘플링의 경우 ICAR에서 Nasal swab 진행 및 보관
- Swab sample의 Sample stabilizer에 보관 및 실험실로 이동



그림 4. 27 cm Double guarded nasal swab (대동물용 swab, Pacific VET)

- 송아지 호흡기 병원체 역학조사

- 인도 샘플의 경우, ICAR에서 nasal swab sample로부터 핵산 추출을 진행하여 한국 축산데이터(주) 실험실로 송부
- 한국 샘플의 경우, Nasal swab sample 한국축산데이터(주) 실험실에 보관 후, 핵산 추출
- Pubmed 및 Genbank를 이용하여 유전자 서열 검색 및 primer-probe design을 통한 각각의 병원체(BVDV, BRSV, PI-3, IBR, Influenza D virus 등)에 대한 PCR 및 real-time PCR 실험법 셋팅
- 다양한 소 호흡기 병원체를 한번에 조사할 수 있는 multiplex real-time PCR법 셋팅
- 한국 축산데이터에서 핵산 및 real-time PCR을 이용한 소 호흡기 질병 원인체 발병 조사(BVDV, BRSV, PI-3, IBR, Influenza D virus 등)
- (한국) Swab 샘플의 세포배양 & 바이러스 배양 시스템을 이용한 바이러스 분리 및 동정
- 바이러스 분리 동정을 통한 whole-genome sequencing 진행

- 유전자 분석 및 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, NGS) 빅데이터를 통한 병원체군 조사

- 주요 바이러스들의 대표서열(reference sequence) 들을 포함한 이미 알려진 서열(sequence) 정보를 public database로부터 다운로드
- Next generation sequencing (NGS) 장비를 이용하여 raw read data 및 새로운 바이러스의 서열 확보구축된 데이터베이스의 서열들과 새로운 서열들을 이용한 상동성 분석(pairwise sequence comparison)과 계통 분석(phylogenetic analysis)을

- 통해 새로운 바이러스와 기존의 바이러스들과의 identity 확인, origin 유추 및 어떤 속 (genus) 또는 목 (family)에 속하는지 확인
- 기존에 알려진 서열 정보 및 포지션 정보를 바탕으로 open reading frame(ORF), motif 등을 찾아 새로운 바이러스 서열 annotation
 - 데이터베이스 내에서, 새롭게 얻어진 바이러스 서열과 가장 유사한 대표 서열 (reference sequence) 선택
 - 선택된 대표 서열을 기준으로 raw read들을 mapping 하여 변이(variant)들이 존재하는지 확인
 - Annotation 결과를 바탕으로, 발견된 variant들의 위치 및 기존 바이러스들과의 차이 확인
 - 새롭게 구축한 데이터베이스를 기반으로, 신종 바이러스 서열이 상동성 분석, 계통 분석, 변이분석 과정을 통해 다양한 변이들을 빠르게 찾을 수 있는 파이프라인 구축
 - 나라별/축종별/연령별/지역별에 따라 유전자 서열 분석 진행
 - 계통발생학적 분석을 통한 나라별/축종별/연령별/지역별 유전자 서열 비교
 - Raw data를 이용하여 군집분석 통해 병원체 군체 비율 상관성 조사

라. 참고문헌

Ackermann, M.R., Derscheid, R. and Roth, J.A., 2010. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 26(2), pp.215-228.

Buczinski, S. and Pardon, B., 2020. Bovine respiratory disease diagnosis: What progress has been made in clinical diagnosis?. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36(2), pp.399-423.

Collin, E.A., Sheng, Z., Lang, Y., Ma, W., Hause, B.M. and Li, F., 2015. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *Journal of virology*, 89(2), pp.1036-1042.

Chai, H.H., Lim, D., Chai, H.Y. and Jung, E., 2013. Molecular modeling of small molecules as BVDV RNA-dependent RNA polymerase allosteric inhibitors. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(3), pp.837-850.

Edwards, T.A., 2010. Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Veterinary clinics: Food animal practice*, 26(2), pp.273-284.

Ellis, J.A., 2001. The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(3), pp.535-550.

Grissett, G.P., White, B.J. and Larson, R.L., 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(3), pp.770-780.

Han, D.G., Ryu, J.H., Park, J. and Choi, K.S., 2018. Identification of a new bovine viral diarrhea virus subtype in the Republic of Korea. *BMC veterinary*

research, 14(1), pp.1–7.

Hause, B.M., Ducatez, M., Collin, E.A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A.D. and Webby, R.J., 2013. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS pathogens*, 9(2), p.e1003176.

Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., Wang, D., Nelson, E.A. and Li, F., 2014. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio*, 5(2), pp.e00031–14.

Hoppe, I.B.A.L., de Souza-Pollo, A., de Medeiros, A.S.R., Samara, S.I. and Carvalho, A.A.B., 2019. HoBi-like pestivirus infection in an outbreak of bovine respiratory disease. *Research in Veterinary Science*, 126, pp.184–191.

Joshi, V., Bhanuprakash, A.G., Mandal, R.S.K., Alam, S., Gupta, V.K. and Dimri, U., 2018. Oxidative stress and imbalance of serum trace mineral metabolism contribute to bovine respiratory disease in dairy calves. *Indian Journal of Animal Sciences*, 88(3), pp.295–299.

Kamdi, B., Singh, R., Singh, V., Singh, S., Kumar, P., Singh, K.P., George, N. and Dhama, K., 2020. Immunofluorescence and molecular diagnosis of bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza virus in the naturally infected young cattle and buffaloes from India. *Microbial Pathogenesis*, 145, p.104165.

Liu, R., Sheng, Z., Huang, C., Wang, D. and Li, F., 2020. Influenza D virus. *Current opinion in virology*, 44, pp.154–161.

Mishra, N., Pattnaik, B., Vilcek, S., Patil, S.S., Jain, P., Swamy, N., Bhatia, S. and Pradhan, H.K., 2004. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Veterinary Microbiology*, 104(3–4), pp.207–212.

Mishra, N., Rajukumar, K., Pateriya, A., Kumar, M., Dubey, P., Behera, S.P., Verma, A., Bhardwaj, P., Kulkarni, D.D., Vijaykrishna, D. and Reddy, N.D., 2014. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), pp.239–246.

Murakami, S., Sato, R., Ishida, H., Katayama, M., Takenaka-Uema, A. and Horimoto, T., 2020. Influenza D virus of new phylogenetic lineage, Japan. *Emerging infectious diseases*, 26(1), p.168.

Oem, J.K., Lee, E.Y., Lee, K.K., Kim, S.H., Lee, M.H. and Hyun, B.H., 2013. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Veterinary microbiology*, 162(1), pp.224–227.

Park, B.K., Yoo, H.S., Kim, D.W., Heo, Y., An, S.H. and Kim, Y.H., 1988.

Retrospective studies on bovine respiratory syncytial virus infection in Korea. Research Reports of the Rural Development Administration, Veterinary, Korea Republic, 30(1), pp.23-26.

Park, J.H. and Kim, D., 2019. Detection of Respiratory Viral Pathogens and Mycoplasma spp from Calves with Summer Pneumonia in Korea. Journal of Veterinary Clinics, 36(4), pp.185-189.

Seong, G., Oem, J.K. and Choi, K.S., 2013. Pathogenetic differences after experimental infection of calves with Korean non-cytopathic BVDV-1 and BVDV-2 isolates. Veterinary immunology and immunopathology, 156(1-2), pp.147-152.

Yang, D.K., Kim, B.H., Kweon, C.H., Park, J.K., Kim, H.Y., So, B.J. and Kim, I.J., 2007. Genetic typing of bovine viral diarrhea viruses (BVDV) circulating in Korea. Journal of Bacteriology and Virology, 37(3), pp.147-152.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 연구 내용

■ 한국 소 농장 nasal swab 샘플링

- 강원도를 제외한 **전국 33개의 소 농장**에서 샘플링 진행하였으며, **총 1,114개의 nasal swab 샘플**을 확보하였음 (표 1).

표 1. 한국 nasal swab 샘플링 소 농장 정보

농장	축종	위치	샘플 수
경기1	한우	안성	9
경기2	한우	안성	22
경기3	한우	안성	87
경기4	한우	포천	47
경기5	한우	포천	44
경기6	한우	포천	8
경기7	한우	양평	102
경기8	한우	여주	20
충북1	한우	청주	16
충북2	한우	청주	7
충남2	한우	예산	17
충남4	젃소/한우	공주	101
충남5	한우	청양	44
충남6	한우	청양	34
충남7	한우	청양	14
충남8	젃소	당진	119
충남9	한우	서산	36
충남10	한우	홍성	27
전북1	한우	부안	71
전북2	젃소/한우	부안	9
전북3	젃소 한우	남원	86
전북4	한우	정읍	5
전북5	한우	김제	8
전남1	한우	장흥	8
전남2	한우	장흥	5
전남3	한우	영암	7
전남4	한우	영암	9
전남5	한우	고흥	6
경북1	한우	봉화	17
경북3	한우	구미	47
경남1	젃소	산청	62
경남2	한우	창녕	13
경남3	한우	합천	7
	합계		1,114

- Nasal swab 이외에도 **충북 제천 소재 도축장에서 총 151개의 폐 조직을 확보**하였을 뿐만 아니라, **충남/충북소재 2개농장에서 총 392개 전혈** (충남: 379개, 충북: 13개)을 확보, 혈청을 분리한 후 연구를 수행하였음.

■ 인도 소 농장 nasal swab 샘플링

- 인도 현지 대학 (Acharya Narendra Deva University of Agriculture & Technology, ANDUAT) 현지 농가를 대상으로 축산/수의관련 서비스를 제공하는 업체인 Delta livestock solution사와 한국축산데이터 인도법인을 통해 현지 네트워크를 구축하였음.
- 구축된 네트워크를 이용하여 20개 인도 소 농장으로 대상으로 총 1,000개의 nasal swab 샘플을 확보하였음.
- Nasal swab 샘플은 현지 ANDUAT 및 Delta livestock solution사에서 유전자를 추출한 후 -80도에 보관한 후, 한국축산데이터 연구소로 호흡기 질병 병원체 검사를 위하여 운반되었음.
- 이 후, 한국축산데이터에서 호흡기 질병 병원체 검사를 수행하였음



그림 5 Nasal swab 샘플링 교육

표 2. 인도 nasal swab 샘플링 소 농장 정보

농장	축종	위치	샘플 수
1	Buffalo/Holstein	Haryana	50
2	Holstein	Haryana	50
3	Holstein	Haryana	50
4	Holstein	Punjab	50
5	Holstein	Punjab	50
6	Holstein	Haryana	50
7	Holstein	Haryana	50
8	Holstein	Haryana	50
9	Holstein	Haryana	50
10	Holstein	Punjab	50
11	Buffalo	Punjab	50
12	Buffalo, Gir, Holstein	Pubjab	50
13	Buffalo	Pubjab	50
14	Buffalo	Pubjab	50
15	Buffalo, Holstein	Pubjab	50
16	Buffalo	Haryana	50
17	Buffalo	Haryana	50
18	Buffalo	Haryana	50
19	Buffalo	Haryana	50
20	Sahiawwl	Haryana	50
합계			1,000

■ 소 호흡기 바이러스들의 Multiplex real-time PCR 진단법 개발

- Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1, 2, infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine parainfluenza type 3 (PI-3), bovine respiratory syncytial virus (BRSV), Influenza D virus (IDV)에 대한 구조에 대해 조사하였음 (표 3).
- 그 후, 바이러스의 진단과 관련된 타겟 유전자를 선정하고 그와 관련된 유전자 서열을 조사하였음.

표 3. 바이러스 및 타겟 정보

No.	Species	Target Gene	Gene ID	RNA type	Sequence
1	Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)	BVDV1_5'-UTR R	1489735	ss RNA virus	>NC_001461.1
		BVDV2_5'-UTR R	37627257	ss RNA virus	>NC_039237.1:1
2	Bovine Parainfluenza -3 (PI-3)	M gene	1489786	ss RNA virus	>NC_002161.1:3735-4790
3	Bovine orthopneumo virus (BRSV)	N gene	1489809	ss RNA virus	>NC_001989.1:1129-2330
4	Bovine Herpes virus type 1 (BHV=IBR)	gB gene (UL27)	72301796	ds DNA virus	>NC_063268.1:5564-58401
5	Influenza D virus (IDV)	PB1 gene		ss RNA virus	>JQ922306.1

- 소 호흡기 바이러스(BVDV1, 2; IBR; PI-3; BRSV; IDV)의 Primer 및 Probe 선정하였음(표 4). 기존에 보고된 문헌들을 조사한 뒤, 국내에서 작용하지 않는 부위는 자체적으로 서열을 제작하여 최종 실험 조건들에 맞게 선정하였음.

표 4. 소 호흡기 병원체 검출을 위한 primer 및 probe 정보

Target Gene	Virus	Primer name	Aplicon Size	Sequence	Modif (5')	Modif (3')	Reference
BVDV_5'-UTR	BVDV	BVDV_F	168 (BVDV 1); 165 (BVDV 2)	CTCGAGATGCCATGTGGAC	FAM	BHQ-1	1
		BVDV_R		CTCCATGTGCCATGTACAGC			
		BVDV1_P		CAGCCTGATAGGGTGCTGCA GAGGC			
		BVDV2_P		CACAGCCTGATAGGGTGTAG CAGAGACCTG			
BRSV_N gene	BRSV	BRSV_real_F3	122	CACTTTCAACAAGGATCAAC	ROX	BHQ-2	자체제작
		BRSV_real_P1		TAGTACAGGTGACAACATTG			2
		BRSV_real_R3		GCATACCACACAACTTATTG			자체제작
PI3_M gene	PI3	PI3_F4	113	TGCTCCTCAATGTCTTCCAC T	Cy5.5	BHQ-1	자체제작
		PI3_P4		TGAACTGCACAGCAATTGGA TCA			
		PI3_R4		ACAATGCCATGGACTTAGGG A			
BHV_gB gene	BHV	BHV_real_F2	97	TGTGGACCTAAACCTCACGG T	Cy5	BHQ-2	3
		BHV_real_P2		AGGACCGCAGTTCTTGCCG C			
		BHV_real_R2		GTAGTCGAGCAGACCCGTGT C			
IDV	IDV	IDV-B_Hause_F	136	GCT GTT TGC AAG TTG ATG GG	FAM	BHQ-1	4
		IDV-B_Hause_P		TTCAGGCAAGCACCCGTAGG ATT			
		IDV-B_Hause_R		TGAAAGCAGGTA ACTCCAAG G			

- 그 후, multiplex real-time PCR을 진행하기 위해 조합을 선정하고, multiplex와 simplex real-time PCR의 결과를 비교하여 multiplex real-time PCR의 효율을 확인하였음.
- Multiplex real-time PCR의 효율을 위해 병원체 3개씩 하여 총 2개의 set를 선정하였으며, Set 1은 BVDV1, BVDV2, BRSV를 검출하게 하였으며(표 5), Set 2에서는 PI-3, IBR, PI-3를 검출할 수 있게 결정하였음 (표 6).
- Set의 비교를 위해 각 타겟 유전자 시퀀스의 plasmid를 제작하여 준비한 뒤, 농도 별로 실험하여 R2값을 비교하였음. 그 결과, multiplex real time PCR의 R2값은 0.978 - 0.997로 singleplex real-time PCR은 0.983 - 0.994로 확인되었음.
- 타겟 호흡기 병원체를 검출하는데 multiplex real-time PCR이 적합한 것으로 판단 있는 것으로 판단하였음 (표 5, 6).

표 5. BVDV 1/2 및 BRSV에 대한 Multiplex 및 simplex real-time PCR 비교 결과

Contents	Multiplex real-time PCR Set 1 (BVDV1, 2, BRSV)	Simplex real-time PCR (BVDV1, 2, BRSV)
Amplification figure		
Standard Curve		
Correlation	R2= 0.997	R2= 0.994
Explanation	BVDV 1 multiplex	BVDV 1 simplex
Amplification figure		

Standard Curve		
Correlation	R2= 0.988	R2= 0.991
Explanation	BVDV 2 multiplex	BVDV 2 simplex
Amplification figure		
Standard Curve		
Correlation	R2= 0.988	R2= 0.991
Explanation	BRSV multiplex	BRSV simplex

표 6. IDV, IBR 및 PI-3에 대한 Multiplex 및 simplex real-time PCR 비교 결과

Contents	Multiplex real-time PCR Set 2 (IDV, BHV[IBR], PI-3)	Simplex real-time PCR (IDV, BHV[IBR], PI-3)
Amplification figure		
Standard Curve		
Correlation	R2= 0.988	R2= 0.984
Explanation	IDV multiplex	IDV simplex

Amplification figure		
Standard Curve		
Correlation	R2= 0.978	R2= 0.983
Explanation	BHV multiplex	BHV simplex
Amplification figure		
Standard Curve		
Correlation	R2= 0.989	R2= 0.985
Explanation	PI-3 multiplex	PI-3 simplex

- 본 연구결과는 2022년 대한 수의학회에 발표되었음

P-058

Development of One Step Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for 3 Pathogens Causing Cattle Respiratory Diseases Complex in Nasal Swabs in Korea

Jeong Byoung Chae, Seung-Uk Shin, Hyunsoo Roh, Junwoo Park, So Rin Jeong, Hae In Oh, Hansong Chae, Seung Woo Cho, Chul Jun Goh, Jung Won Kang*
Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Korea

Bovine respiratory disease complex (BRDC) is the major cause of serious respiratory tract infections in calves. The disease is multifactorial, with either stress or reduced immunity allowing several pathogens to emerge. Since there have been various pathogens causing BRDC in calves, fast and accurate methods for detecting pathogens were necessary for the prevention of BRDC. In this study, we have developed a one-step multiplex real-time Polymerase Chain Reaction capable of detecting three viral pathogens (bovine viral diarrhea virus type 1, BVDV1; bovine viral diarrhea virus type 2, BVDV2; bovine respiratory syncytial virus, BRSV), simultaneously. To clarify the detection limits of developed assay, *in-vitro* transcribed RNA containing each pathogens RNA were generated and used as a template. And then, a total of 237 nasal swabs from calves up to 1 years old were collected from 7 farms in Korea during 4 months and all collected samples were investigated for these three pathogens. As a result, positive nasal swabs for BVDV1 and 8 positive nasal swabs for BVDV2 were detected in total. There was no BRSV in our samples. Further research would be needed to detect BRSV in calves and also other pathogens related to BRDC.

그림 30 2022년 대한수의학회 발표 초록

■ 송아지 호흡기 질환 병원체 검사 및 유전적 특성 규명

- 확보된 총 한국 소 샘플 1,657개 및 인도 소 nasal swab 샘플 1,000개를 대상으로 본 연구에서 수립한 multiplex real-time PCR 진단법을 이용하여 총 6종 병원체에 대한 검출을 수행하였음. 그 결과, **한국 샘플에서는 IDV를 제외한 5종의 호흡기 병원체가 검출되었으며, 병원체 중 BVDV1/2가 양성율은 0.9% 및 1.1%로 타 병원체 대비 높은 양성율이 관찰되었음** (표 7). 이는 앞으로 BVDV에 대한 지속적인 모니터링과 백신접종 등 BVDV에 대한 예방에 연구도 지속적으로 수행되어야 할 필요가 있을 것으로 생각됨.
- **인도 nasal swab 샘플에서는 IDV를 비롯한 검사한 모든 6종 병원체가 검출이 되었음.** 병원체 중 BVDV1/2가 4.5%, 1.6%로 한국과 마찬가지로 가장 높은 양성율을 나타냈으나, **한국과는 달리, BVDV1이 높게 관찰되었음.** 또한, 한국 샘플에서 검출되지 않은 IDV의 경우, **인도 샘플에서는 1.0%의 양성율을 확인하였음** (표 7).
- 국내 소 농가 호흡기 병원체 양성율은 인도 대비 낮을 것으로 확인되었음. 이는 국내 소 농가의 사양관리가 인도 대비 양호하기 때문인 것으로 추정됨. 이는 앞으로 **해외에서 질병 병원체 유입에 지속적으로 대비할 필요가 있다**는 것을 의미함.

표 7. 한국과 인도 소 샘플을 이용한 호흡기 병원체 6종 검사 결과

국가	샘플	검출 병원체 수(%)					
		BVDV1	BVDV2	BRSV	BHV	PI-3	IDV
한국	Nasal swab (N=1,114)	10 (0.9%)	16 (1.5%)	5 (0.4%)	-	1 (0.1%)	-
	폐 조직 (N=151)	2 (1.3%)	1 (0.7%)	1 (0.7%)	-	1 (0.7%)	-
	혈청 (N=392)	3 (0.8%)	1 (0.3%)	-	2 (0.5%)	1 (0.3%)	-
	종합 (N=1,657)	15 (0.9%)	19 (1.1%)	5 (0.3%)	2 (0.1%)	3 (0.2%)	-
인도	Nasal swab (N=1,000)	45 (4.5%)	16 (1.6%)	3 (0.3%)	2 (0.2%)	1 (0.1%)	10 (1.0%)

- 호흡기 6종의 Nasal swab 샘플링 한 농장별 양성율은 BVDV1 및 BVDV2의 경우, 한국은 33개 농장중 BVDV1은 6개 농장(18%), BVDV2는 11개 농장(33%)에서 양성인 반면에, **인도는 20개 농장 중, BVDV1은 13개 농장 (65%), BVDV2는 8개 농장 (40%)에서 양성샘플이 검출되었음.** 또한, **IDV의 경우, 인도 4개농장 (20%)에서 양성샘플이 검출되었음** (표 8).

표 8. 한국, 인도 호흡기 병원체 6종 농장 현황 (Nasal swab 샘플)

병원체	양성 농장 수	
	한국 (총 33개)	인도 (총 20개)
BVDV1	8 (24%)	13 (65%)
BVDV2	11 (33%)	8 (40%)
BRSV	3 (9%)	2 (10%)
BHV	-	1 (5%)
PI-3	1 (3%)	-
IDV	-	4 (20%)

- 또한, 감염형태를 보았을 때 **한국의 경우, 33개의 농장 중, 각각 5개의 농장에서 BVDV2 단독감염 (15%) 및 BVDV1+BVDV2 복합감염 (15%)이 가장 높은 형태로 확인되었음**. 인도의 경우, 한국과 유사한 형태로 BVDV 단독 감염과 BVDV1+BVDV2 복합감염 농장이 가장 많은 것으로 관찰되었음 (표 9). 인도의 결과를 보았을 때 도에서 BVDV1, BVDV2 및 IDV에 의한 호흡기 감염이 상당수의 농장에서 발생하는 것을 의미하며, 향후, 인도로부터 소 호흡기 병원체의 유입에 대하여 주의를 할 필요가 있음.

표 9. 한국, 인도 호흡기 병원체 6종 농장 현황 (Nasal swab 샘플)

병원체	양성 농장 수	
	한국 (총 33개)	인도 (총 20개)
BVDV1	3 (9%)	4 (20%)
BVDV2	5 (15%)	4 (20%)
BRSV	2 (6%)	1 (3%)
IDV	-	1 (3%)
BVDV1+BVDV2	5 (15%)	4 (20%)
BVDV1+BRSV	1 (3%)	-
BVDV1+IDV	-	2 (10%)
BVDV1+BHV	-	1 (3%)
BVDV2+PI-3	1 (3%)	-
BVDV1+BRSV+IDV	-	1 (3%)

- 또한, 양성이 확인된 샘플들은 유전자 염기서열 분석을 통하여 계통분석을 실시하였음.
- BVDV의 경우, 5 UTR (288bp)를 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였음 (참고문헌 5). 한국, 인도 양성샘플 77개 중, 29개의 샘플이 분석되었음. BVDV1은 총 9개 (한국: 7 샘플, 인도: 2 샘플), BVDV2는 총 20개 (한국: 20 샘플)로 확인되었음. 계통분석 결과, 총 10개의 BVDV1 중, 1개는 BVDV1d이었으며, 나머지 9개는 BVDV1b로 확인되었음. BVDV2는 모두 BVDV2a로 확인 되었음.

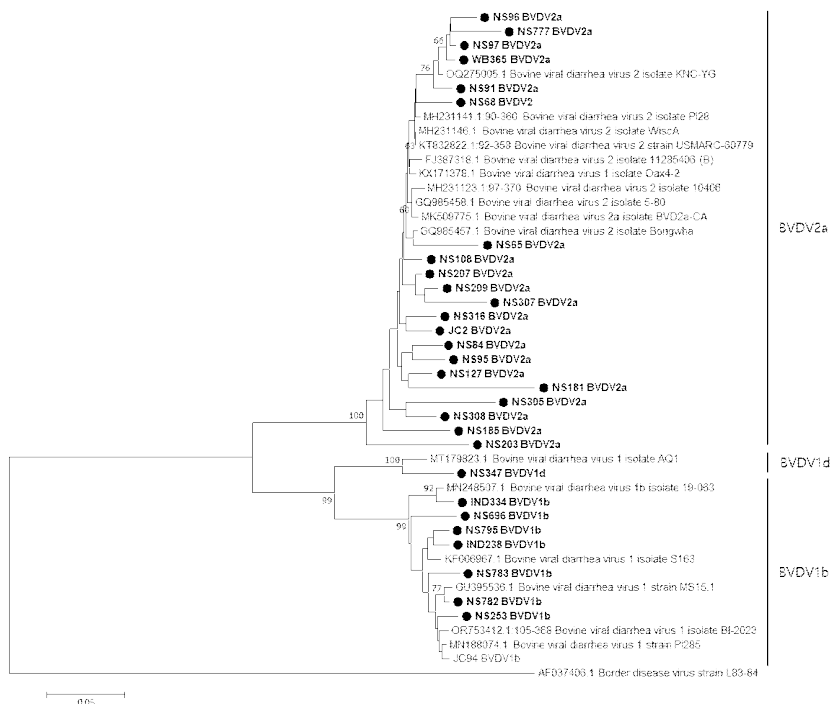


그림 31 Phylogenetic tree of BVDV based on 5 UTR

- BRSV의 경우, Glycoprotein (G) 유전자를 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였음 (참고문헌 6) 총 8개의 양성 샘플 중, 4개 한국 샘플에서 BRSV G 유전자가 증폭이 되었음. 그 결과, 4개 양성 샘플 모두 같은 cluster를 형성한 것으로 확인되었으며, 기존에 보고된 균주들과는 cluster를 형성하지 않았음.

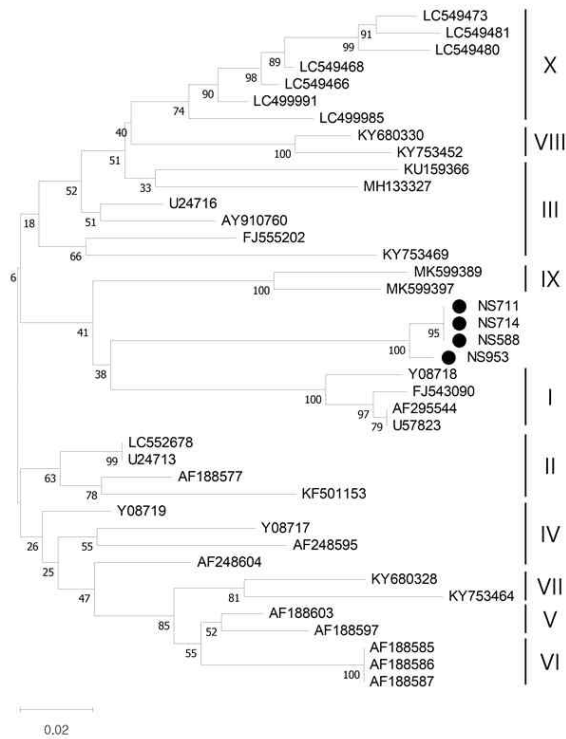


그림 32 Phylogenetic tree of BRSV based on G protein

- BHV, PI-3, IDV의 경우, real time RT-PCR에서는 검출이 되었지만. 유전자 염기서열 분석을 위한 RT-PCR에서는 모두 검출이 되지 않아, 추가적인 분석이 불가능하였음.
- 본 연구에서 목표로 한, 우리나라에 IDV에 대한 현황조사를 수행한 결과, 총 1,675개 샘플을 이용하여 검출을 수행한 결과, IDV 양성 샘플을 확인할 수 없었음. 하지만, 최근 국내연구에 의하면, 2022년에 수집된 총 999개의 소 샘플 (nasal swab: 954개, 폐 조직: 45개)를 real time RT-PCR 진단법을 이용하여 진단을 한 결과, 경기 및 경북 소재 농장에서 수집된 14개의 nasal swab 샘플에서 IDV가 검출되었음 (양성율 1.4%)(참고문헌 7). 최근 보고와 본 연구결과를 종합하여 볼 때, IDV는 국내에 존재하고 있으나, 낮은 양성율을 고려할 때, BVDV같은 주요 소 호흡기 병원체는 아닌 것으로 여겨지나, 국내에서 그동안 알려지지 않았던 병원체인 관계로 추가적인 monitoring이 필요할 것으로 여겨짐.
- 본 연구를 통해 한국 및 인도의 소 호흡기 병원체 6종의 발생률에 대한 현황 및 주요 병원체의 유전적 특징을 확인할 수 있었으며, 해외 병원체의 유입 감시에 대한 필요성을 확인하였음.

■ 송아지 호흡기 질환 병원체 (BVDV) 분리 및 유전적 특성 규명

- BVDV는 Flaviviridae Pestivirus속으로 소에서 호흡기, 소화기, 생식기, 면역계에 모두 증상을 나타낼 수 있는 질병으로 알려져 있음.
- BVDV는 현재까지 BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 (Hobi-like)로 총 3가지 type으로 보고되고 있으며, 각 type에서 subtype의 형태로 보고되고 있음. 현재 BVDV-1은 1a부

터 1q까지 보고되었고, BVDV-2는 2a부터 2d까지 보고되었음. BVDV-3의 경우 BVDV-1과 BVDV-2와는 달리 아직까지 subtype은 많이 연구되지 않았음.

- 국내의 경우, BVDV는 주로 송아지 설사증과 관련되어 많이 보고되었으며, 주로 BVDV-1b type과 BVDV-2a type이 보고되고 있으며, 그 외 BVDV-1a, BVDV-1c, BVDV-1d, BVDV-1f, BVDV-1o 등이 보고되었음 (참고문헌 8).
- BVDV의 경우, 소화기 뿐만 아니라 호흡기에서 주요 원인으로 작용할 수 있지만, 아직까진 국내에서는 연구가 부족하여 호흡기 원인에 대한 중요성에 대한 인식이 많이 없음. 따라서 본 연구에서는 BVDV를 호흡기에서 조사하였고, 그 과정 중 바이러스를 분리하여 호흡기 바이러스의 특성을 분석하였음.
- BVDV 양성 nasal swab, serum, 폐 조직 샘플을 이용하여 Madin-Darby bovine kidney 세포 (MDBK)에 접종하여 cytopathogenic effect (CPE)가 관찰되는 샘플을 회수하여 PCR을 수행하였으며, 총 4회 실시하여 BVDV를 분리하였음. 이후, CPE 양성 샘플은 -80도에 보관하여 유전적 특성규명에 이용하였음.
- BVDV 유전적 특성은 5 UTR, E2, Npro 유전자를 증폭하여, 유전자 염기서열 분석을 실시하여 분석하였음.
- 그 결과, 총 31개의 BVDV 양성 샘플을 이용하여 분리를 시도한 결과, 총 5개의 샘플에서 CPE를 확인하였고, PCR 및 염기서열 분석을 통하여 BVDV임을 확인하여, **총 5개의 BVDV 분리주를 확보하였음.**
- 분리된 5 BVDV 균주를 이용하여 5UTR, E2, Npro 염기서열 분석결과, 3개는 BVDV1b로, 2개 균주는 BVDV2a로 확인되었음.

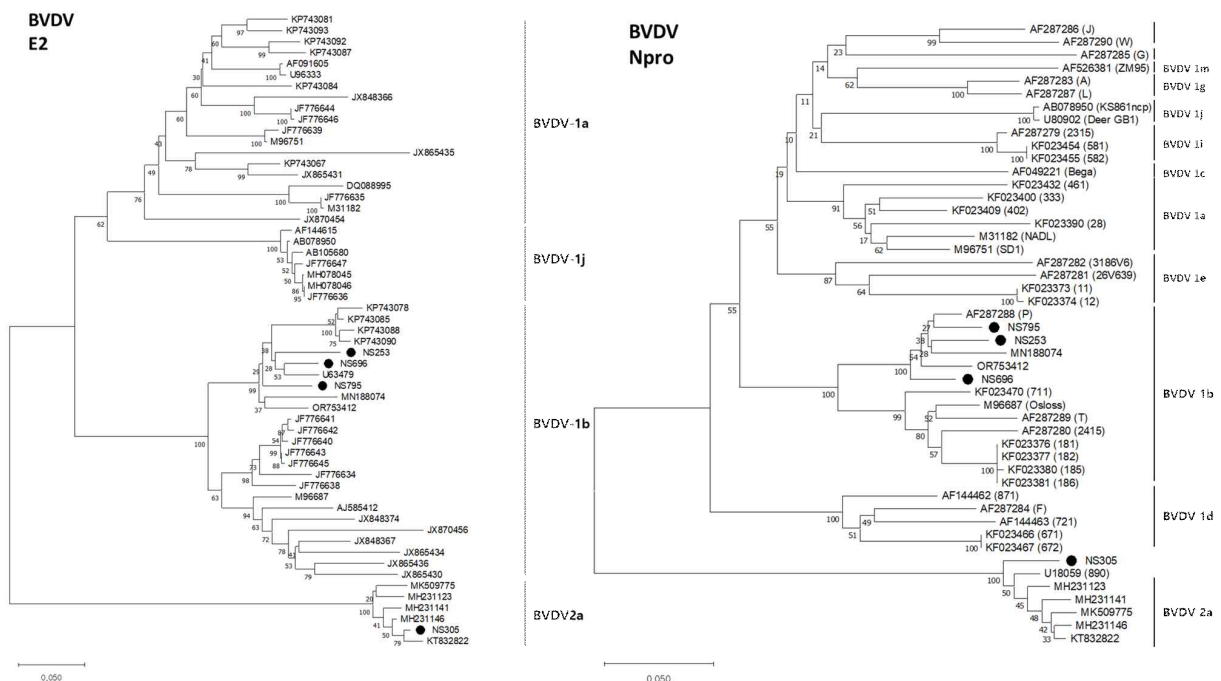


그림 33 Phylogenetic tree of 5 BVDV isolates based on E2 and Npro gene

- 또한, **1개의 분리균주 (BVDV2a)를 이용해 전장유전체 (whole genome sequencing) 분석을 수행**하여, 추가적인 특징을 분석하였음.
- 그 결과, 분리된 BVDV2a 균주는 전장유전체 분석결과에서도 BVDV2a 균주로 확인되었으며, BVDV2a 참고 균주 염기서열 (MH231141)와 비교한 결과 96.85% 일치하는 것으로 확인되었음 (표 10).

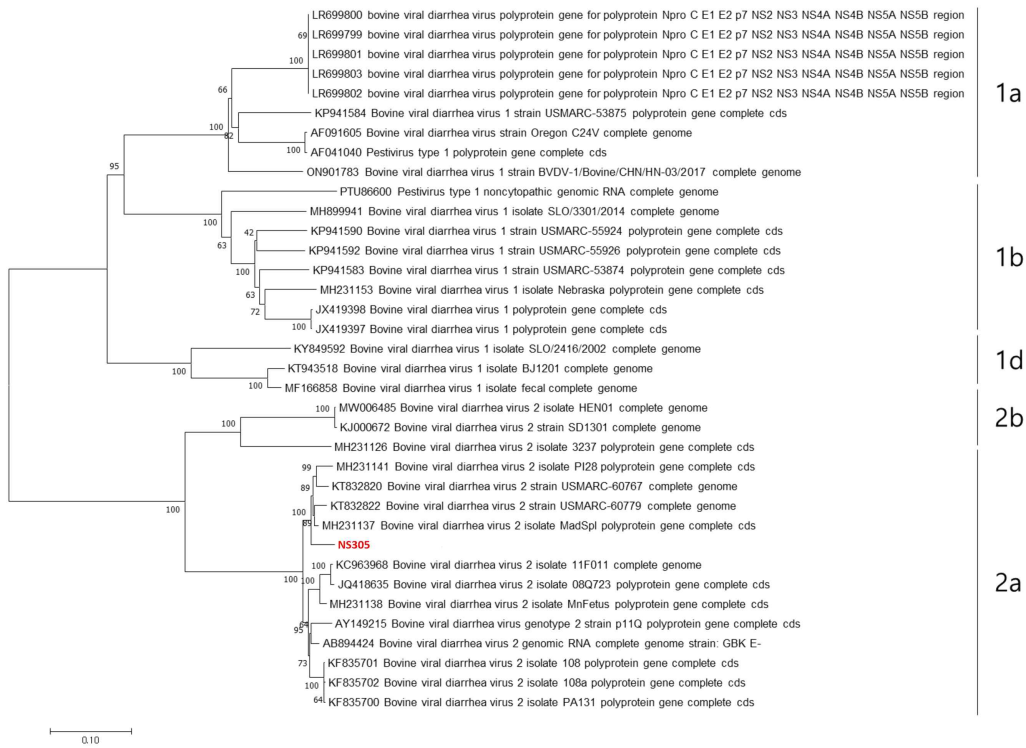


그림 34 Phylogenetic tree of 1 BVDV isolate based on complete genome sequences

표 10. BVDV2a (MH231141) 전체 유전자 비교 결과

Genome size (bp)	Nucleotide Identity (%)										
	Complete genome	Npro	C	Erns	E1	E2	P7-N S2	NS3	NS4B	NS5A	NS5B
12,237	96.85	97.42	98.37	96.92	97.44	96.06	97.51	97.60	97.98	96.71	97.22

■ 송아지 호흡기 질환 병원체 (BRSV) 분리 및 분리주 유전적 특성 규명

- BRSV는 Paramyxovirus과, Orthopneumovirus속 으로 소에서 호흡기 질환을 유발하는 병원체로 알려져 있음.
- BRSV 양성 nasal swab샘플을 이용하여 MDBK 세포에 접종하여 CPE가 관찰되는 샘플을 회수하여 PCR을 수행하였으며, 총 4회 실시하여 BRSV를 분리하였음. 이후, CPE 양성샘플은 -80도에 보관하여 유전적 특성규명에 이용하였음.
- BRSV 유전형은 Glycoprotein (G), Fusion (F), Nucleocapsid (N) 유전자들을 증폭한 후, 염기서열 분석을 실시하였음 (참고문헌 6).
- 총 5개의 BRSV 양성 샘플을 이용하여 분리를 시도한 결과, 총 1개의 샘플에서 CPE를 확인하였고, PCR 및 염기서열 분석을 통하여 **총 1개의 BRSV 분리주를 확보하였음.**
- 계통 분석 결과, 확보한 1개의 분리주는 G, F gene을 이용한 계통 분석 시에는 기존에 알려진 subgroup에 속하지 않는 것을 확인하였으며, N gene의 경우에는 중국, 미국, 독일 분리 균주들과 같은 cluster를 형성하는 것을 확인하였음.

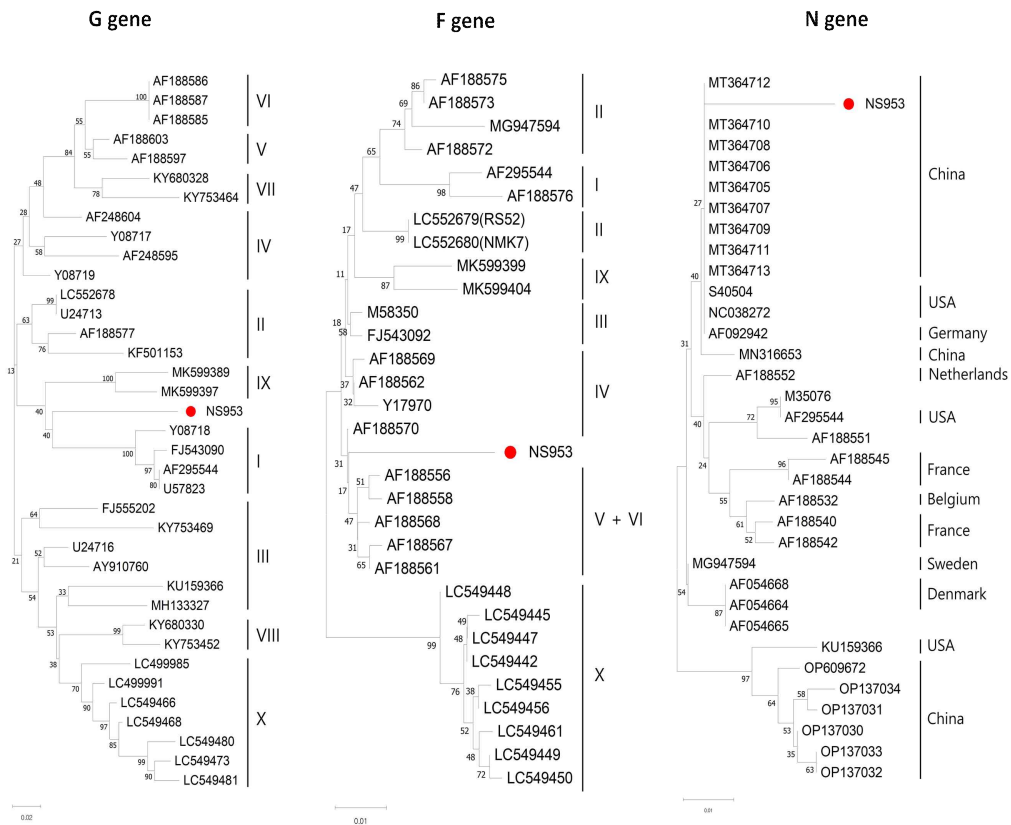


그림 35 Phylogenetic analysis of 1 BRSV isolate based on G, F and N gene

- 향후, 추가 분석을 통하여, 국내 분리 BRSV의 특성을 규명할 예정임. 본 연구결과는 2022년 대한수의학회에 발표 되었음

P-006
Prevalence and molecular characteristics of Bovine Respiratory Syncytial Viruses (BRSV) in Korea
 Jung Won Kang^{1,*,} Serim Kim^{1,} Jeong Byoung Chae^{1,2,} Seung-Uk Shin^{1,} Young Mi Jo^{1,} Hyunsoo Roh^{1,} Hansong Hansong^{1,} Won Gyeong Kim¹
¹Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Republic of Korea, ²Laboratory of Veterinary Internal Medicine, BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Centre, Research Institute for Veterinary Science and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 05326, Republic of Korea
 Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is an important pathogen of the bovine respiratory disease complex (BRDC). However, its prevalence and molecular characteristics in Korea is have remained largely unexplored. In this study, 1,122 nasal swabs from 34 farms in 7 provinces were collected, and 0.4% (5/1,122) of samples were determined as BRSV-positive by RT-qPCR. Furthermore, molecular characterization for one BRSV isolate was conducted, focusing on the nucleotide sequences of glycoprotein (G), fusion (F) and nucleocapsid (N) gene. As results, G and F gene of the isolate was not clustered to any subgroup. On the other hand, N gene of the isolate was found to cluster with BRSVs from China, USA and Germany. In conclusion, these findings contribute to our understanding of the prevalence and molecular characteristics of BRSV in Korea, and indicate that further studies to comprehensively characterize BRSV in Korea are necessary.

그림 36 2022년 대한수의학회 발표 초록

■ 송아지 설사유발 병원체 분포 조사

- 송아지 설사는 축산 업계에서 주요 우려 사항 중 하나로, 신생 송아지의 성장 감소 및 발병률 및 사망률 증가로 인해 상당한 경제적 손실을 야기함. 송아지 설사는 환경적 요인, 관리, 감염 원인 등 다양한 요인에 의해 발생할 수 있으나, 바이러스, 세균, 원충 등의 관련 병원체 송아지 설사의 주요 원인 중 하나로 간주되고 있음. 송아지 설사와 관련된 주요 병원체로는 Bovine Rotavirus (BRV), Bvine Coronavirus (BCV), bovine viral diarrhea viruds (BVDV), Cryptosporidium parvum (C. parvum), Giardia spp., 및 Eimeria spp. 등이 있음 (참고문헌 9-12).
- 송아지 설사와 관련된 병원체의 분포를 조사하기 위해 확보된 강원, 충북을 제외

한 15개 농장에서 810개의 분변샘플을 확보하여 fecal scoring을 수행하였음. 그 결과, 526개의 정상 대변 (fecal score 0: 267개, fecal score 1: 259개) 및 284개의 설사변 (Fecal score: 2, 178개, fecal score 3: 106개)을 확보하였음. 농장별 샘플 정보는 다음과 같음

표 11. 소 분변 샘플 정보

Farm IDs	Locations	No. of animals				
		Fecal scores				
		0	1	2	3	Total
1	경기	13	16	7	1	37
2	경기	23	13	5	1	42
3	경기	18	26	28	26	98
4	경기	63	38	20	13	134
5	충남	5	13	10	5	33
6	충남	39	44	29	8	120
7	충남	23	23	9	6	61
8	충남	12	13	6	3	34
9	충남	0	6	8	4	18
10	충남	19	9	9	6	43
11	전북	22	17	23	19	81
12	전남	14	19	12	5	50
13	경북	6	4	1	1	12
14	충남	2	7	1	1	11
15	경남	8	11	10	7	36
Total		267	259	178	106	810

- 이 후, 송아지 설사 관련된 주요 병원체들을 검사하여 병원체의 분포를 조사 하였음. 검사는 병원체 별로 기존에 보고된 conventional PCR (PCR), real time PCR 진단법을 이용하여 검출하였음 (참고문헌 13-17). 사용한 primer 및 probe 정보는 다음과 같음 (표 12)
- 이 후, 각 병원체와 fecal score간의 상관관계를 파악하기 위해 the Pearson's χ^2 and linear by linear association 분석을 수행하였음

표 12. 송아지 설사 병원체 7종 검사에 사용된 primer 및 probe 정보

검사 방법	병원체	Primers, probes	5'- 3'	참고문헌
PCR	BCV	Forward	CTA GTA ACC AGG CTG ATG TCA ATA CC	13
		Reverse	GGC GGA AAC CTA GTC GGA ATA	
	BRV	Forward	TCA ACA TGG ATG TCC TGT ATT CCT	14
		Reverse	TCC CCC AGT TTG GAA TTC ATT	
Real-time PCR	BVDV	Forward	CTC GAG ATG CCA TGT GGA C	15
		Reverse	CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA	
		BVD type 1 - Probe (FAM/BHQ1)	CAG CCT GAT AGG GTG CTG CAG AGG C	
		BVD type 2 -	CAC AGC CTG ATA GGG TGT AGC	

		Probe (HEX/BHQ1)	AGA GAC CTG	
Real-time PCR	<i>C. parvum</i>	Forward	CAA ATT GAT ACC GTT TGT CCT TCT GT	16
		Reverse	GGC ATG TCG ATT CTA ATT CAG CT	
		Probe (HEX/BHQ1)	TGC CAT ACA TTG TTG TCC TGA CAA ATT GAA	
	<i>Giardia</i> spp.	Forward	CAT CCG CGA GGA GGT CAA	16
		Reverse	GCA GCC ATG GTG TCG ATC T	
		Probe (FAM/BHQ1)	AAG TCC GCC GAC AAC ATG TAC CTA ACG A	
	<i>Eimeria</i> spp.	Forward	AAA GGA TGC AAA AGT CGT AAC AC	17
		Reverse	TGC AAT TCA CAA TGC GTA TCG	
		Probe (FAM/BHQ2)	TGT TTC TAC CCA CTA CAT CCA AC	

- 그 결과, **BRV (14.0%, 113/810)가 가장 많이 검출**되었으며, *C. parvum* (9.8%, 79/810), BVDV2 (4.9%, 40/810), BCV (3.2%, 26/810), BVDV1 (2.1%, 17/810), *Eimeria* spp. (1.9%, 15/810), 그리고 *Giardia* spp. (0.9%, 7/810) 순으로 검출되었음. 검사한 7가지 병원체 중에서 **BRV ($p < 0.01$), *C. parvum* ($p < 0.001$), 및 *Eimeria* spp. ($p < 0.05$)의 양성율이 fecal score가 높을수록 증가 하였음).**

표 13. Fecal score에 따른 송아지 설사 병원체 7종 양성율

병원체	Fecal scores (No. of animal, %)					P values	
	0	1	2	3	Total	Pe	Li
	(n= 267)	(n=259)	(n=178)	(n=106)	(n=810)		
BRV	33 (12.4%)	30 (11.6%)	21 (11.8%)	29 (27.4%)	113 (14.0%)	<0.001	0.004
BCV	7 (2.6%)	8 (3.1%)	4 (2.2%)	7 (6.6%)	26 (3.2%)	0.189	0.170
BVDV1	3 (1.1%)	8 (3.1%)	3 (1.7%)	3 (2.8%)	17 (2.1%)	0.408	0.414
BVDV2	12 (4.5%)	12 (4.6%)	7 (3.9%)	9 (8.5%)	40 (4.9%)	0.336	0.277
<i>C. parvum</i>	12 (4.5%)	21 (8.1%)	28 (15.7%)	18 (17.0%)	79 (9.8%)	<0.001	<0.001
<i>Eimeria</i> spp.	2 (0.7%)	4 (1.5%)	5 (2.8%)	4 (3.8%)	15 (1.9%)	0.174	0.027
<i>Giardia</i> spp.	3 (1.1%)	3 (1.2%)	1 (0.6%)	0 (0.0%)	7 (0.9%)	0.662	0.257

Pe, Pearson' s chi-square test; Li, linear by linear association

- 기존 우리나라 연구결과에 의하면, BRV 및 *C. parvum*, 및 *Eimeria* spp.가 우리나라의 송아지 설사의 주요 원인으로 보고되었음 (참고문헌 18)
- 본 연구에서도 기존 연구결과와 마찬가지로 BRV가 가장 많이 검출되었으며, 그 뒤로 *C. parvum*, BVDV2, BCV, BVDV1, *Eimeria* spp., *Giardia* spp. 순으로 확인되었음. 일부 병원체의 유병률의 차이는 지리적, 진단법, 시간적 차이로 인한 것으로 생각되나, 본 연구의 결과는 이전 조사들과 일관성이 있어서 유의한 차이점이 없음. 하지만, *Eimeria* spp.는 fecal score와 통계적으로 유의한 연관성을 보였지만, 검출율이 낮기 때문에 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단됨.
- 본 연구를 통해 우리나라에서 발생하는 주요 송아지 설사관련 병원체에 대한 양성율을 다시 한번 확인할 수 있었음. 또한, BRV의 경우, 상용 백신은 있지만, 아직까지 효율적으로 control하지 못하고 있고, *C. parvum*의 경우 현재 전 세계적으로

효과적인 치료법이 보고되어 있지 않기 때문에, 송아지 설사를 효과적으로 예방할 수 있는 법에 대해서 추가적인 연구가 필요하다는 것을 시사하고 있음.

- 본 연구결과는 2022년 추계수의학회에 발표 되었음

P-057

Prevalence of Various Pathogens Causing Calf Diarrhea in Korea

Jeong Byoung Chae, Seung-Uk Shin, Hyunsoo Roh, Junwoo Park, So Rin Jeong, Hae In Oh, Hansong Chae, Seong Woo Cho, Chul Jun Goh, Jung Won Kang*

Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Korea

Calf diarrhea is one of the most prevalent diseases in cattle industries. It has affected the morbidity and mortality of neonatal calves and their growth performances and has caused worldwide economic loss. There have been reported the impacts of pathogens causing diarrhea in calves. In this study, 7 pathogens (Bovine rotavirus group A (BRV), Bovine coronavirus (BCV), Bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV 1), Bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV 2), Cryptosporidium spp., Giardia spp., Eimeria spp.) causing calf diarrhea were investigated in the feces of calves in 7 farms using reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR. As a result, feces from 286 calves up to 60 days of age were collected during April to August 2022. Among 7 pathogens, Cryptosporidium spp. (28/286, 9.8%) were the most prevalent pathogens, followed by BRV (21/286, 7.3%), BVDV 2 (15/286, 5.2%), Eimeria spp. (7/286, 2.4%), Giardia spp. (4/286, 1.4%), BCV (4/286, 1.4%), and BVDV 1 (3/286, 1.0%). The information of these prevalence of pathogens would contribute to developing strategies for prevention and treatment of calf diarrhea in Korea.

그림 37 2022년 추계수의학회 발표 초
록

■ 송아지 설사유발 병원체 (Bovine Rotavirus) 분리 및 유전적 특성 규명

- BRV 양성 샘플 분변을 이용하여 Madin-Darby bovine kidney 세포 (MDBK)에 접종하여 cytopathogenic effect (CPE)가 관찰되는 샘플을 회수하여 PCR을 수행하였으며, 총 4회 실시하여 BRV를 분리하였음. 이 후, CPE 양성샘플은 -80도에 보관하여 유전적 특성규명에 이용하였음.
- BRV의 유전적 특성은 주요 genome segment이며 유전형을 구별하는 VP4 (P 형) 와 VP7 (G 형) 부위를 증폭 (VP4: 863 bp, VP7: 1062 bp) 하여 유전자 염기서열 분석을 실시하여 규명하였음 (참고문헌 14).
- 총 113개의 BRV 양성 분변샘플을 이용하여 BRV 분리를 시도한 결과, 총 27개의 샘플에서 CPE를 확인하였고, PCR 및 염기서열 분석을 통하여 **총 27개의 BRV 분리주를 확보하였음.**
- VP7을 이용하여 분리된 BRV의 유전적 특성을 규명한 결과, 27개 분리주 중 24개가 G6 형, 3개가 G8형 이었음. VP4의 경우, 27개 모두 P5형으로 확인 되어, 27개 중 24개의 분리주 (89%)가 G6P[5]형으로 나타났음. 이는 **국내 유행하는 BRV는 대부분 G6P[5]형**임을 의미하며, 이는 기존의 연구결과와 같은 것으로 확인되었음 (참고 문헌 19).



그림 38 Phylogenetic analysis of BRV based on VP4 and VP7

■ 차세대 염기서열분석법 (NGS)을 이용한 송아지 호흡기 관련 신규 바이러스 검출

- 송아지 호흡기 병원체들을 진단하는 방법으로는 원인체들을 직접 동정하거나, 적절한 샘플에서 병원체들의 존재를 확인하는 실험실적 방법들이 주로 사용되고 있음. 이러한 방법들은 민감하지만, 다양한 한계점들이 있었고, 증상이 있었음에도 진단이 되지 않는 병원체들의 역할도 많이 존재하였음.
- 최근 차세대염기서열 분석(Next generation sequencing, NGS)은 기존 병원체들의 진단법에 대한 한계점을 극복하는 새로운 진단법으로 인정되고 있으며, 검사체 내에서의 유전자를 전부 증폭시키는 방법을 통해 기존에 검출되지 않았던 기존의 병원체들의 검출 뿐만 아니라 보고되지 않은 새로운 병원체 검출에도 많이 이용되고 있음 (참고문헌 20).
- 따라서 본 연구에서도 호흡기 임상증상이 있으나, 병원체 진단이 되지 않는 샘플들이 확인되어, 기존에 알려지지 않은 unknown 소 호흡기 병원체가 있을 것으로 판단되었음. 이에 NGS를 이용하여 신규 바이러스 병원체들을 검출하고자 하였음.
- 국내에서 채취한 기존 6개 송아지 호흡기 병원체 음성이나, 호흡기 임상증상을 보인 43개의 nsal swab 샘플을 9개로 나눠 pooling 한 후, pooled 샘플을 이용하여 NGS를 수행하였음. 상세 과정은 다음과 같음.
- Library는 total RNA에서 rRNA를 제거한 뒤, 남아있는 mRNA를 조각된 다음 random primer와 reverse transcriptase를 이용하여 첫 번째 stranded cDNA를 제작하였음. 그 후, DNA Polymerase I, RNase H, and dUTP를 이용하여 두 번째 stranded cDNA를 제작하였음. 마지막으로 한 개의 A base 추가와 adapter 연결을 통해 최종 repair 단계를 거친 뒤, PCR을 통해 최종 cDNA library를 제작하였음. 제작된 cDNA library는 Illumina NovaSeq을 통해 sequencing이 진행되었음.
- Sequencing data는 Trim Galore (v.0.6.1)를 이용하여 Quality checking과 trimming이 진행되었으며, Deconseq (v0.4.3)을 이용하여 70% query와 90% coverage의 기준에 따라 virus reads들이 추출되었음. 그 후, SPAdes assembler를 이용하여 contig들을 assemble한 뒤, BLAST+를 통해 NCBI viral database에 matching하였음. 그 후, 발견된 virus sequence의 90% 이상 매칭된 바이러스들을

분석하였음.

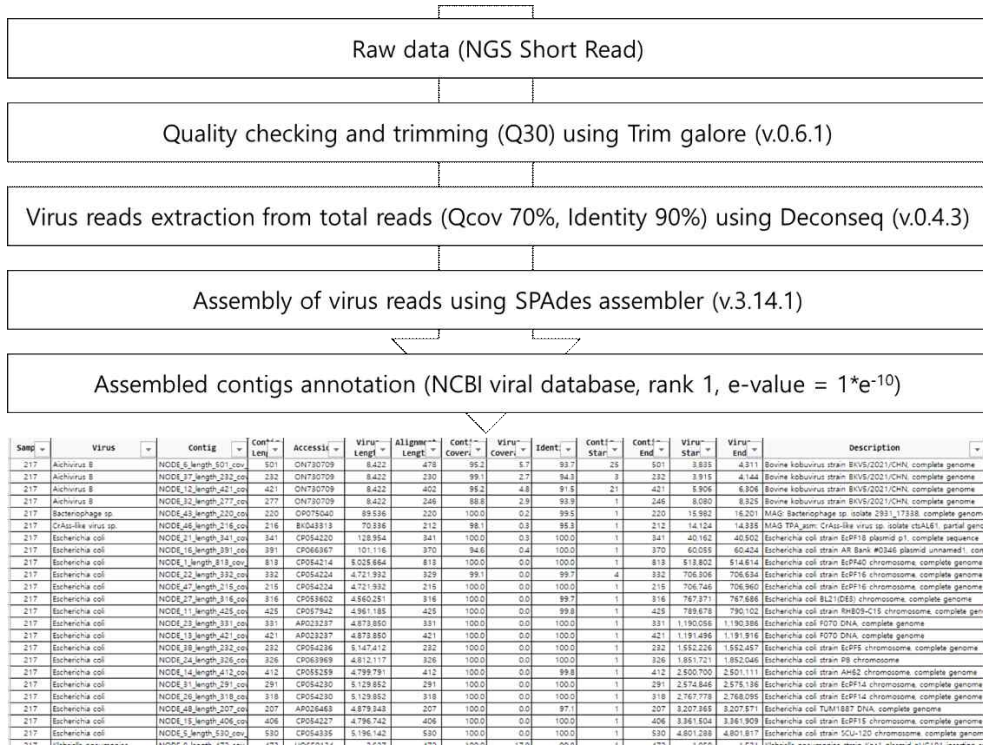


그림 39 Schematic diagram of the procedure for detecting viral sequences in calf diarrhea

- 총 9개 pooled 샘플에서 5종류 virus의 거의 전체 유전자 염기서열이 확보되었으며, 샘플 별 확인된 virus 종류는 다음과 같음.

표 13. NGS를 이용한 바이러스 검출 결과 (Nasal swab 샘플)

Detected Virus	Sample description	No. of samples
Bovine coronavirus	1,2,3,4,5,6,9	7/9
Bovine rhinitis A virus	3,5,6,7 *7 (suspicious co-infected with BRVA1 and 2)	4/9
Bovine rhinitis B virus	4,5,6,7,8,9	6/9
Bovine torovirus	8	1/9

- Bovine rhinitis virus A (BRAV)**의 유전체 크기는 일반적으로 약 7.0-8.0 kbp로 알려져 있음. 9개 샘플 중, 5개에서 BRBV RNA (7500-7585bp)가 확인되었으며, 모두 BRAV 1형으로 확인되었음. 단, 1개 샘플에서는 BRAV 1/2형 모두 검출되었음. 전체 유전체를 기존에 알려진 균주와 비교한 결과, BRAV1형 참고 균주 염기서열 (NC038303)와는 81.3-83.3%, BRAV2형 참고 균주 염기서열 (JN936206)와는 80.4-84.8% 동일한 것으로 확인되었음.
- Picornaviridae 과에 속하는 Aphthovirus인 **BRAV**는 1960년대 독일에서 발견된 이

래, 미국, 영국, 일본, 중국등에서 존재가 보고되었으며, **소 호흡기 질병 (BRDC, Bovine respiratory disease complex)과 관련이 있는 병원체로 알려져 있음** (참고 문헌 21-23). 하지만, **우리나라에서는 그 존재가 보고가 된 바는 없음**.

- 본 연구를 통해 **국내 최초로 신종 바이러스인 BRAV 존재 및 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 국내 BRAV의 유전적 특성 및 해외 BRAV와 비교 연구들을 통한 BRAV 감시 및 소 호흡기 병원체 진단에 있어 많은 기여를 할 것으로 판단됨.

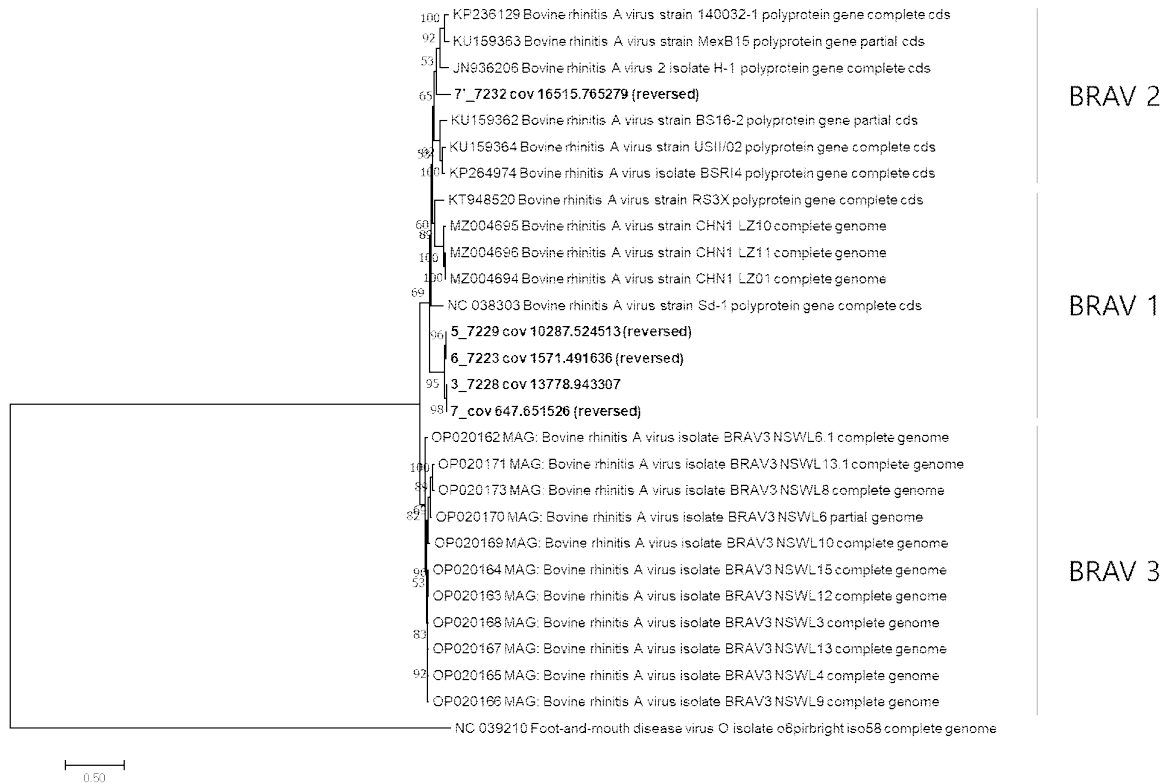


그림 40 Phylogenetic tree of BRAV based on nearly complete genome sequence

표 14. BRAV type 1 균주 (NC038303)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)												
	Genome	Lab	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	VPg	3C pro	3D pol
3	83.3	80.3	80.6	82.4	83.0	78.3	81.7	84.5	85.3	84.1	84.7	85.2	85.6
5	83.2	79.5	81.0	82.0	82.4	77.2	81.7	84.8	85.2	84.7	84.7	84.7	85.9
6	83.2	79.5	81.0	82.0	82.4	77.2	81.7	84.8	85.2	84.7	84.7	84.5	85.9
7	83.3	80.3	81.0	83.0	83.0	78.3	81.7	84.5	85.3	84.1	83.3	85.3	85.5
7'	81.3	82.7	78.9	74.6	72.0	72.3	-	81.1	84.2	84.7	81.9	85.5	86.7

-, Not calculated (less than 25%)

표 15. BRAV type 2 균주 (JN936206)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)												
	Genome	Lab	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	VPg	3C pro	3D pol
3	80.5	80.5	79.2	72.8	73.2	74.0	81.7	83.6	83.6	82.0	-	84.7	85.3

5	80.7	79.3	79.2	72.9	74.4	74.3	81.7	84.3	82.7	82.0	81.9	84.4	86.4
6	80.7	79.3	79.2	72.9	74.4	74.3	81.7	84.3	82.7	82.0	81.9	84.2	86.4
7	80.4	80.5	79.6	72.8	73.2	74.0	81.7	83.5	83.6	82.0	-	84.9	85.2
7'	84.8	79.5	79.9	82.0	79.6	78.6	-	87.1	88.5	87.2	87.5	87.9	89.2

-, Not calculated (less than 25%)

- **Bovine rhinitis virus B (BRBV)**의 유전체 크기는 일반적으로 약 7.0-8.0 kbp로 알려져 있음. 9개 샘플 중, 6개에서 BRBV RNA (7,500-7,585bp)가 확인되었으며, 모두 3개 샘플은 BRBV 1형, 2개는 BRBV 3형, 1개는 BRBV 2형으로 확인되었음. 검출된 6개 샘플은 BRBV 1형 참고 균주 염기서열 (NC010354)와 77.3-88.7%, BRBV2형 참고 균주 염기서열 (KY432299)와 77.6-93.9%, BRBV 3형 참고 균주 염기서열 (KP264975)와 77.2-92.6% 동일한 것으로 확인되었음. 다만, 2A 유전자는 25% 이하로 나타난 샘플들이 존재하였음.
- Picornaviridae 과에 속하는 Aphthovirus인 BRBV는 1971년에 영국에서 분리되었으며, 당시에는 bovine rhinovirus로 분류되던 BRAV의 한 종류로 추정되었음. 이후에는 BRAV에 대한 중화 시험에서 교차 반응이 없다는 이유로 BRAV와 구분되었음. 최근, **BRBV가 BRDC로 진단받은 소에 대한 metagenomic 연구 등을 통해서 중국, 일본, 미국 등 여러 국가에서 보고되었음** (참고문헌 21-23). 하지만, **우리나라에서는 그 존재가 보고가 된 바는 없음.**
- 본 연구를 통해 **국내 최초로 신종 바이러스인 BRBV 존재 및 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 국내 BRBV의 유전적 특성 및 해외 BRBV와 비교 연구들을 통한 BRBV 감시 및 소 호흡기 병원체 진단에 있어 많은 기여를 할 것으로 판단됨.

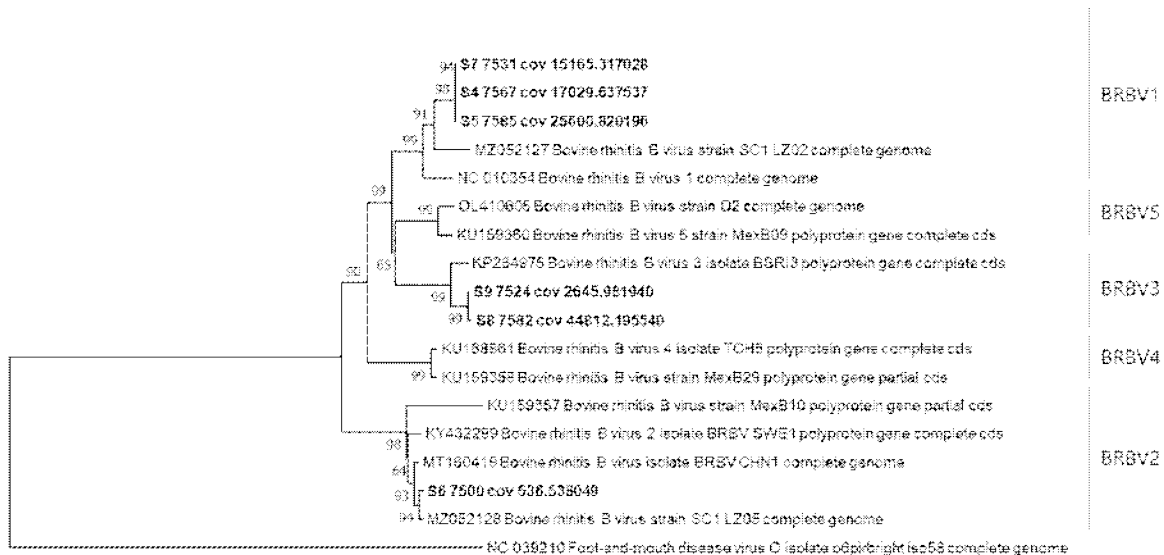


그림 41 Phylogenetic tree of BRBV based on nearly complete genome sequence

표 16. BRBV type 1 균주 (NC010354)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)												
	Genome	LP	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
4	88.7	88.2	88.4	86.4	89.7	88.6	81.2	89.8	90.2	88.7	84.0	87.8	89.7

5	88.7	88.6	88.4	86.6	89.7	88.6	82.1	89.8	90.0	89.0	84.0	87.8	89.6
6	77.3	82.5	80.4	61.4	69.3	57.2	-	79.2	79.1	77.4	88.0	87.5	89.9
7	88.7	88.4	88.0	86.4	89.7	88.6	81.2	89.8	90.2	88.7	84.0	87.8	89.7
8	80.4	87.9	80.4	70.5	72.8	65.3	-	79.3	84.2	81.2	85.3	88.1	88.4
9	80.3	87.9	79.7	70.6	72.5	65.1	-	79.3	84.1	81.2	84.0	88.3	88.4

-, Not calculated (less than 25%); LP, leader peptide

표 17. BRBV type 2 균주 (KY432299)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)												
	Genome	LP	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
4	79.3	81.0	81.5	62.4	68.0	60.4	-	79.5	79.8	81.2	86.7	91.0	93.3
5	79.3	81.2	81.5	62.4	68.0	60.4	-	79.5	79.8	81.2	86.7	91.0	93.2
6	93.9	93.2	93.8	93.3	93.7	94.1	96.6	94.2	94.2	94.0	92.0	92.3	93.9
7	79.3	80.8	81.5	62.4	68.0	60.4	-	79.5	79.8	81.2	86.7	91.0	93.3
8	77.6	81.2	83.0	62.1	66.7	60.4	-	81.6	78.8	76.9	80.0	86.9	88.4
9	77.6	80.4	83.0	62.0	67.1	60.2	-	81.6	79.4	76.9	78.7	87.0	88.5

-, Not calculated (less than 25%); LP, leader peptide

표 18. BRBV type 3 균주 (KP264975)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)												
	Genome	LP	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
4	80.3	87.4	81.5	69.3	72.3	65.9	-	78.5	83.3	83.0	77.3	88.1	88.8
5	80.3	87.6	81.5	69.2	72.3	65.9	-	78.5	83.7	77.7	77.3	88.1	88.9
6	77.2	80.7	82.3	60.9	67.9	59.9	-	80.8	78.9	82.7	85.3	88.1	88.9
7	80.3	87.3	81.9	69.3	72.3	65.9	-	78.5	83.3	82.7	77.3	88.1	88.8
8	92.4	92.4	93.1	92.8	94.4	93.8	94.0	92.9	91.9	92.2	92.0	92.6	90.2
9	92.6	93.1	93.8	92.4	84.5	94.0	94.0	92.9	92.1	92.2	93.3	93.1	90.8

-, Not calculated (less than 25%); LP, leader peptide

- **Bovine torovirus (BToV)**의 유전체 크기는 27.9-28.5 kb로 알려져 있으며, 9개 샘플 중 1개에서 BToV RNA (28,296 bp)가 확인되었음. 계통분석결과, 확인된 1개의 샘플은 중국과 일본에서 보고된 분리균주와 같은 cluster인 것을 확인하였음. 분리된 일본에서 보고된 참고 균주 염기서열 (LC088095)와 97.5% 동일한 것으로 나타났다.
- **BToV의 경우**, 주로 송아지 설사 관련 병원체로 많이 보고되고 있음 (참고문헌 24). 우리나라 역시 송아지 설사증에서만 보고되었으나 (참고문헌 25), 본 연구에서 처음으로 소 호흡기에서 BToV를 검출하였을 뿐만 아니라, 앞으로 소 호흡기 병원체로서의 BToV 관련 추가 연구가 필요하다는 점을 확인할 수 있었음.



그림 42 Phylogenetic tree of BToV based on nearly complete genome sequence

표 19. BToV 균주 (LC088095)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)					
	Complete genome	ORF1ab	S	M	HE	N
8	97.5	97.2	95.5	96.9	96.7	98.0

- **Bovine coronavirus (BCV)**의 경우, 9개 샘플 중 7개 샘플에서 발견되었으며, 그 중 5개 샘플에서는 Nucleocapsid gene을 제외한 나머지 유전자들이 검출되었으며 전체 유전체 크기는 29,375 - 31,062 bp로 확인되었음.
- 계통분석 결과, 모두 betacoronavirus에 속해있는 것이 확인되었으며, 그 중 기존 소 코로나바이러스 및 가축에서 발견된 바이러스는 Merbecovirus에 속해있는 것으로 확인되었음. 기존에 보고된 참고 균주 염기서열 (U00735)와 비교시, 98.3-98.4% 일치하는 것으로 나타났음.
- BCV의 경우, 호흡기 병원체로서의 역할보단 소화기 질병에 조금 더 중요하게 인지되고 있으며, 국내 검사 결과 역시 소화기 쪽에 초점이 맞춰지고 있으나, 현재, NGS를 검사한 9개의 샘플 중에서 7개의 샘플이 확인되는 것으로 볼 때, 국내에서 **호흡기 병원체로서 BCV에 대한 추가적인 연구가 필요할** 것으로 생각됨. 또한, 현재 소 호흡기 질병을 일으키는 BCV와 소 소화기 질병을 일으키는 BCV에 대한 유전적 차이에 대해서도 추가적인 연구를 진행할 필요가 있음 (참고문헌 26).

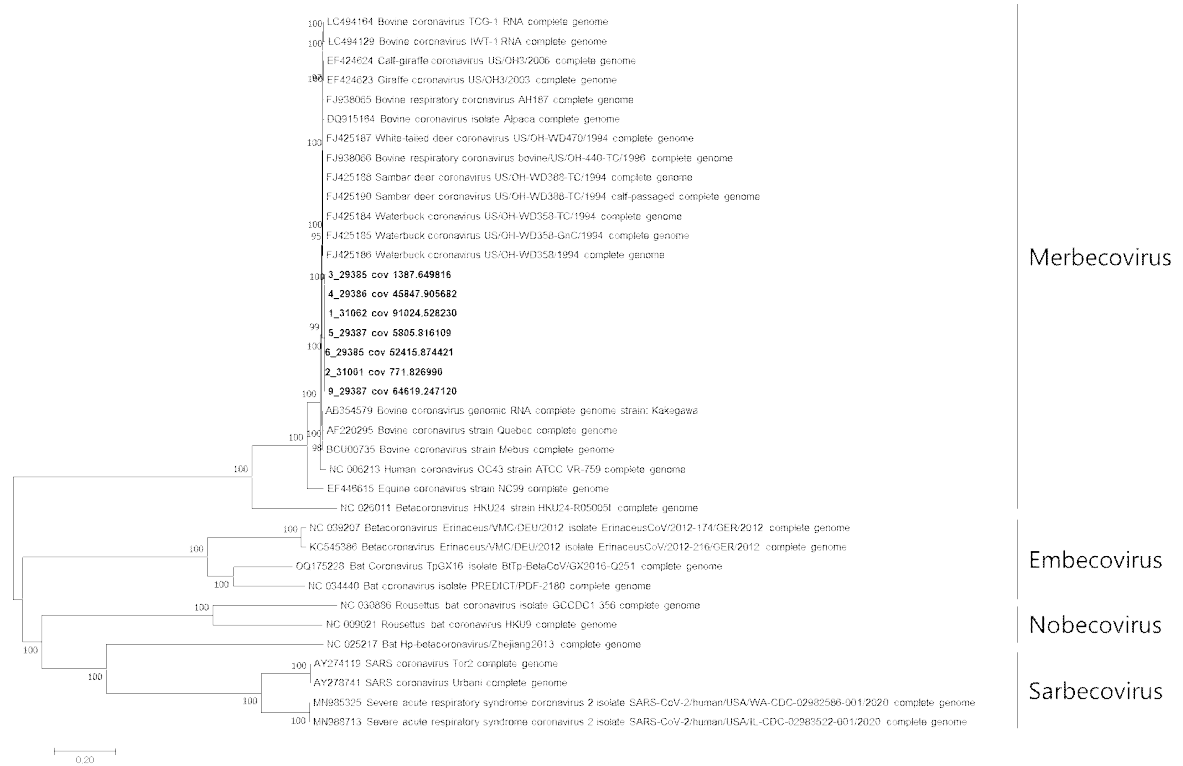


그림 43 Phylogenetic tree of BCV based on nearly complete genome sequence

표 20. BCV 균주 (U00735)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide Identity (%)					
	Complete genome	HE CDS	S gene	E gene	M gene	N gene
1	98.4	97.7	97.5	99.2	98.4	98.17
2	98.4	97.7	97.4	98.8	98.4	98.3
3	98.4	97.7	97.6	99.2	98.3	ND
4	98.4	97.7	97.6	99.2	98.4	ND
5	98.3	97.6	97.5	98.8	98.3	ND
6	98.4	97.5	97.5	98.8	98.1	ND
9	98.4	97.7	97.4	98.8	98.3	ND

ND: not detected

- 임상 샘플에서 병원체를 진단하는 전통적인 방법은 잠재적 감염 요인에 대한 사전 지식이 필요하다는 한계가 있음. 이러한 사전 지식 없이는 진단이 불가능하나, 차세대염기서열분석법 (Next-Generation Sequencing, NGS)는 이러한 제한을 극복하는 데 중요한 도구로 각광받고 있음. NGS의 높은 비용 및 실험 및 분석 중의 잠재적 오류와 같은 여러 어려움에도 불구하고 NGS를 이용한 신/변종 병원체를 발견/분석하는 연구들은 계속해서 진행되고 있음. 본 연구에서는 **최신 NGS 기술을 사용하여 소 호흡기 관련 4가지 새로운 원인 바이러스를 식별하였음. 확인된 4가지 바이러스들은 기존에 우리나라에서 보고되지 않았던 신규 바이러스이거나 (BRAV, BRBV), 호흡기 관련성을 처음으로 확인된 바이러스 (BToV) 및 많은 연구가 진행되지 않은 neglected 병원체 (BCV) 임.**
- 이는 앞으로 소 호흡기 병원체 진단에서 NGS의 유용성 및 기존 병원체 이외에도 본 연구에서 확인된 병원체들을 고려할 필요가 있다는 것을 의미함.

- 본 연구결과는 앞으로 우리나라에서 소 호흡기 관련 병원체에 대한 모니터 및 효과적인 대응 전략 개발에 유용할 하게 이용될 수 있음.

■ **차세대 염기서열분석법을 이용한 송아지 설사관련 신규 바이러스 검출**

- 송아지 호흡기 병원체들을 진단하는 방법으로는 원인체들을 직접 동정하거나, 적절한 샘플에서 병원체들의 존재를 확인하는 실험실적 방법들이 주로 사용되고 있음. 이러한 방법들은 민감하지만, 다양한 한계점들이 있었고, 증상이 있었음에도 불구하고 진단이 되지 않는 병원체들의 역할도 많이 존재하였음.
- 최근 차세대염기서열 분석(Next generation sequencing, NGS)은 기존 병원체들의 진단법에 대한 한계점을 극복하는 새로운 진단법으로 인정되고 있으며, 검사체 내에서의 유전자를 전부 증폭시키는 방법을 통해 기존에 검출되지 않았던 기존의 병원체들의 검출 뿐만 아니라 보고되지 않은 새로운 병원체 검출에도 많이 이용되고 있음 (참고문헌 20).
- 따라서 본 연구에서도 **설사변이지만 병원체 진단이 되지 않는 샘플들이 확인**되어, 기존에 알려지지 않은 unknown 송아지 설사 유발 병원체가 있을 것으로 판단되었음. 이에 **NGS를 이용하여 신규 바이러스 병원체들을 검출**하고자 하였음.
- 국내에서 채취한 기존 7개 송아지 설사 병원체 음성이며 fecal score가 3 이상인 21개의 소 설사 샘플을 이용하여 NGS로 신규 바이러스를 검출하였음. 상세 실험과정은 호흡기 샘플과 동일하게 진행하였음.
- 총 21개의 샘플이 분석되었으며, 21개의 분변샘플 중 18개에서 하나 이상의 바이러스가 검출되었음. 이 중 bovine astrovirus (BAstV), bovine enterovirus (BEV), bovine kobuvirus (BKoV), bovine nebovirus (BNeV), bovine norovirus (BNoV), bovine boosepivirus B (BooV), bovine parechovirus (BParV), bovine torovirus (BToV), C. parvum virus 1 (CSpV1), hunnivirus의 전체 유전자 염기서열을 확보하였음 (표 21).

표 21. NGS를 이용한 바이러스 검출 결과 (설사 분변)

Sample IDs	Farm IDs	Locations	The list of detected virus by NGS
217	1	경기	BKoV, BooV
276	1	경기	BKoV, BooV
53954	2	경기	BKoV, BooV, BAstV, BEV
18897	4	경기	BKoV, BooV, BParV, BEV, hunnivirus
73961	4	경기	BNoV
85282	4	경기	BKoV, CSpV1, hunnivirus
NA_4_516	4	경기	CSpV1
23358	5	충남	BKoV, BooV, hunnivirus
18707	6	충남	BooV, BAstV, CSpV1
NA_4_475	6	충남	BKoV, BooV, BAstV
557	10	충남	-
562	10	충남	CSpV1
566	10	충남	-
12151	10	충남	BAstV, BToV
37284	10	충남	BToV
245	11	전북	CSpV1
48049	11	전북	-

71346	11	전북	BKoV, BooV, BAstV, CSpV1
83561	15		BooV, BNeV, BNoV
86599	13	경북	BAstV
88359	13	경북	BooV

BAstV, bovine astrovirus; BEV, bovine enterovirus; BKoV, bovine kobuvirus; BNeV, bovine nebovirus; BNoV, bovine norovirus; BooV, bovine boosepivirus; BParV, bovine parechovirus; BToV, bovine torovirus; CSpV1, *Cryptosporidium parvum* virus 1; -, not detected.

- **Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)** 은 두 개의 linear dsRNA segments 로 구성되어 있으며, segment 1 (1.7 kb)은 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)을 coding하고 있으며, segment 2 (1.4 kb)는 Capsid protein을 coding하고 있음. 21 개의 분변 샘플 중, 총 6개의 샘플에서 CSpV1의 RNA가 확인되었으며 segment 1은 1,721-1.853 kb, segment 2는 1,486-1539 bp로 나타났음. 계통 분석 결과, **다른 나라에서 보고된 CSpV1와는 다른 독립된 cluster를 형성하는 것으로 확인되었음.** 또한, CSpV1 dsRNA1(RdRp)에 대한 참고 균주 염기서열(NC_038843)과 95.6-96.1%, CSpV1 dsRNA2에 대한 참고 균주 서열 (NC_038844)과 97.8-98.1% 동일 하였음.
- **CSpV1**은 Partitiviridae 과 Crispovirus 속에 속하는 바이러스로서, 1997년 미국에서 *C. parvum*의 포자가 발아된 용집액의 세포질에서 처음으로 존재가 확인되어 보고되었으며, 그 후, 2016년 일본, 2021년 터키에서 그 존재가 보고되었으나 (참고문헌 27-29), **우리나라에서는 보고가 된 바는 없음.**
- CSpV1가 발견된 *C.parvum*은 사람을 포함한 많은 포유동물에서 설사를 유발하는 원충으로서 소에서는 단독 감염되거나 BRV 등과 함께 혼합 감염되어 설사를 유발하는 원인체임. *C.parvum*의 공생 바이러스(symbiotic virus)인 CSpV1이 *C.parvum*의 병원성에 미치는 영향은 아직 확실하게 알려지지 않았지만, *C.parvum*이 CSpV1을 활성화하여 type I형 인터페론 신호를 활성화시키고, 숙주의 anti-parasitic defense를 약화하는 것이 보고되었음 (참고문헌 30).
- 본 연구를 통해 **국내 최초로 신종 바이러스인 CSpV1의 존재 및 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 국내 CSpV1의 유전적 특성 및 해외 CSpV1과 비교 연구들을 통한 CSpV1 감시에 있어 많은 기여를 할 것으로 판단됨.

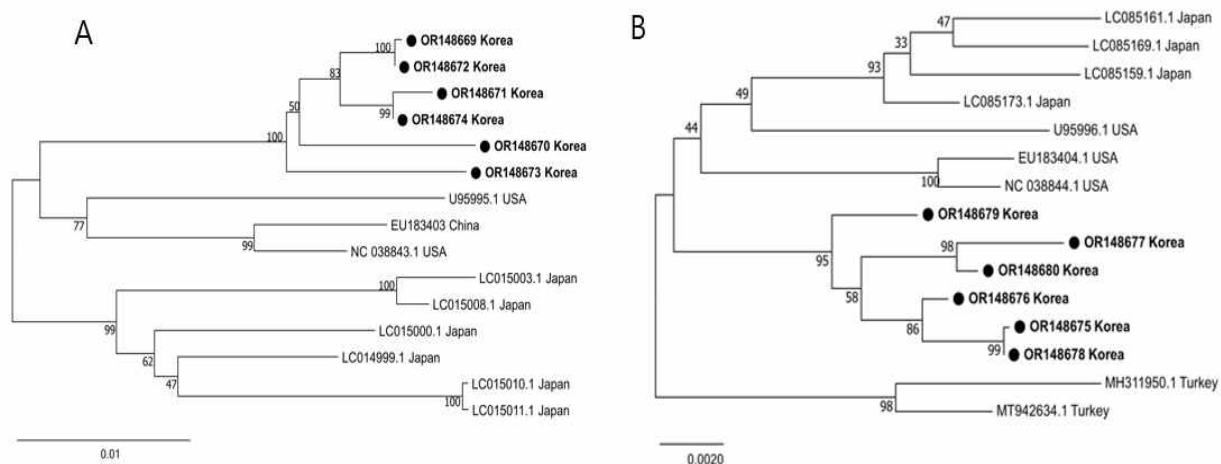


그림 44 Phylogenetic analysis of CSpV1 based on dsRNA1 (A) and dsRNA2 (B) segment

표 22. CSpV1 균주 (NC_038843)와 dsRNA1 segment 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)
	dsRNA1 (RdRp)
00245	95.8
00562	95.6
18707	96.1
71346	95.8
85282	95.8
NA_4_516	96.1

표 23. CSpV1 균주 (NC_038843)와 dsRNA2 segment 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)
	dsRNA2 (capsid protein)
00245	97.8
00562	98.1
18707	97.8
71346	97.8
85282	98.0
NA_4_516	98.0

- **Boosepivirus (BooV)**의 유전체 크기는 일반적으로 7.4-7.7 kb로 알려져 있음. 21개의 분변 샘플 중, 10개에서 BooV RNA (7,613-7,750 bp)가 확인되었으며, 모두 BooV B그룹에 속하였음. 또한, 10개 샘플은 동일 그룹 참고 균주 염기서열 (LC036579)와 83.0-87.3% 동일한 것으로 나타났음.
- Picornaviridae 과에 속하는 **Boosepivirus (bovine, ovine sapelentero-like picornavirus, BooV)**는 **소의 설사증과 관련이 있는 신종 병원체**로 알려져 있으며, BooV A, BooV B, BooV C, 3개의 종으로 나뉘지며, 이중 A, B만 소에서 발견되었음. 또한, 2009년 일본에서 처음 보고가 된 이후, 일본, 미국, 중국에서만 보고가 되었으며, **우리나라에서는 보고가 된 바는 없음 (참고문헌 31-33)**.
- 본 연구를 통해 **국내 최초로 신종 바이러스인 BooV 존재 및 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 국내 BooV의 유전적 특성 및 해외 BooV와 비교 연구들을 통한 BooV의 감시에 있어 많은 기여를 할 것으로 판단됨.

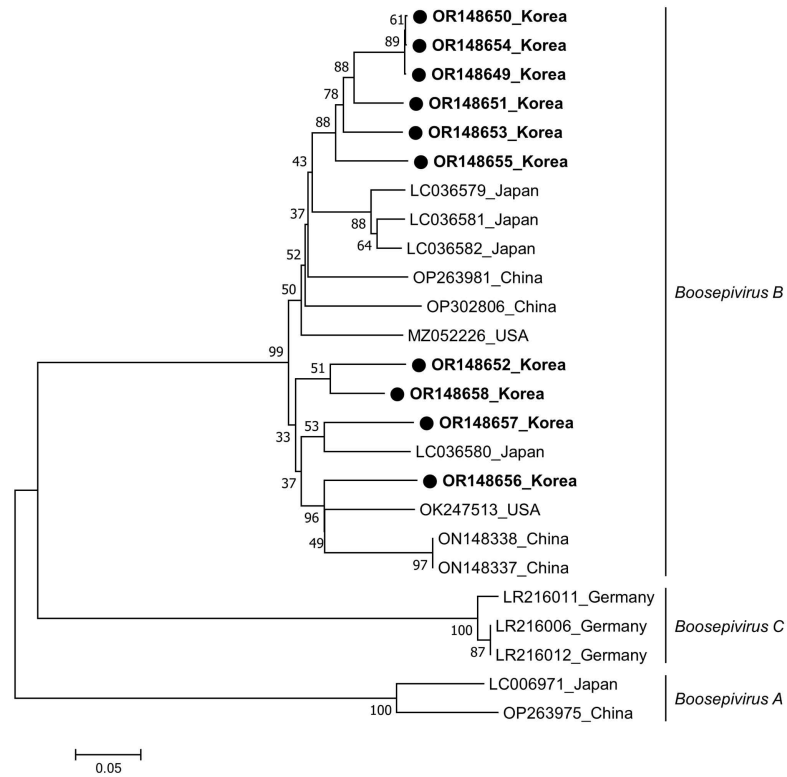


그림 45 Phylogenetic analysis of BooV based on nearly complete genome sequences

표 23. BooV B 균주 (LC036579)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Complete genome	Nucleotide identity (%)										
		L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3C	3D
00217	87.3	89.6	86.1	85.0	87.6	85.1	87.9	86.7	87.5	90.0	88.6	88.6
00276	87.1	89.1	86.1	85.1	87.6	85.4	87.3	86.7	87.4	90.0	88.4	88.6
18707	86.8	90.7	86.6	85.1	88.4	83.6	87.6	85.8	86.6	86.5	89.1	87.8
18897	83.0	88.0	75.1	77.6	80.5	72.7	85.2	83.6	83.7	86.8	88.6	87.7
23358	86.8	88.5	87.6	83.8	87.9	84.5	87.3	85.2	87.4	87.6	88.8	87.7
53954	87.2	89.6	86.1	85.0	87.3	85.6	87.6	86.7	87.4	90.0	88.6	88.6
71346	86.8	88.5	83.1	85.5	86.3	84.6	86.7	87.3	85.0	90.2	88.8	88.9
83561	83.9	86.9	77.1	77.2	78.3	74.1	86.5	84.6	85.7	90.2	89.9	88.3
88359	83.3	89.1	79.1	78.6	82.7	73.1	84.3	85.2	85.8	87.3	89.0	87.0
Na_4_4_75	86.0	89.6	84.6	84.1	86.7	84.8	86.5	83.6	83.8	86.2	88.6	87.8

-, Nucleotide similarity less than 25%.

- **Hunnivirus**의 유전체 크기는 일반적으로 7.28.2-8.4 kb으로 알려져 있음. 21개 분변 샘플 중, 3개에서 Hunnivirus RNA (7,565-7,597 bp)가 확인되었음. 계통 분석

결과, 3개 샘플 모두 Hunnivirus A1에 속하는 것으로 확인되었음. 확인 된 3개 샘플은 Hunnivirus A1 참고 균주 염기서열 (JQ941880)과 81.2-83.9% 동일하였음.

- **Hunnivirus**는 Picornaviridae 과, Hunnivirus 속에 속하는 바이러스로서 **소의 설사증과 관련이 있는 것으로 알려져 있음**. (참고문헌 34) 1965년 북아일랜드에서 양 세포 배양에서 발견된 이래, 헝가리, 미국, 베트남, 중국에서 다양한 종에서 존재하는 것으로 보고되었으나 (참고문헌 35-37), **우리나라에서는 보고가 된 바는 없음**. 아직까지 hunnivirus에 대한 발병기전 등 많은 연구가 보고되지 않아 향후, 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단됨.
- 본 연구를 통해 **국내 최초로 신종 바이러스인 Hunnivirus의 존재 및 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 **국내 Hunnivirus의 유전적 특성 및 해외 Hunnivirus들과 비교 연구들을 통한 Hunnivirus 감시**에 있어 많은 기여를 할 것으로 판단됨.

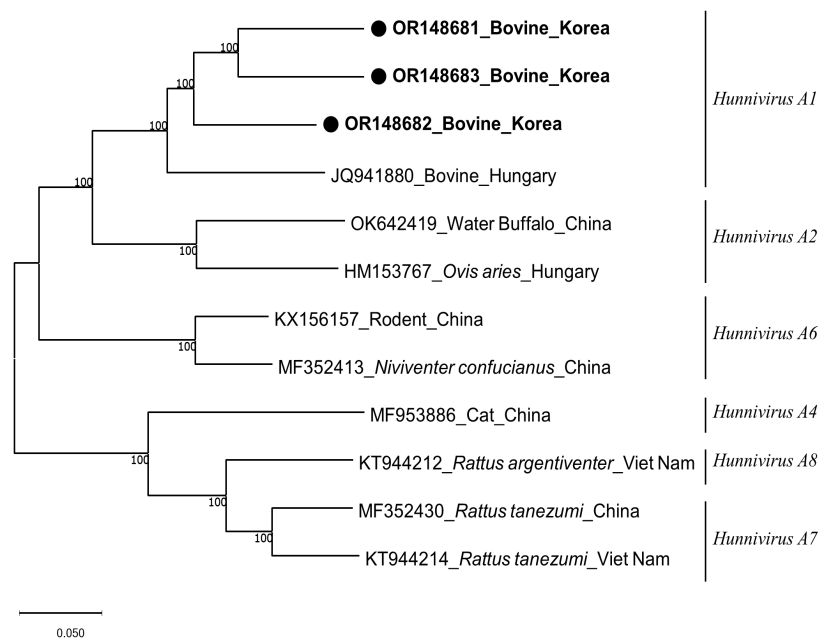


그림 46 Phylogenetic analysis of hunnivirus based on nearly complete genome sequences

표 24. Hunnivirus A1 균주 (JQ91880) 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)											
	Complete genome	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2B	2C	3A	3B	3C	3D
18897	81.3	87.3	84.8	65.4	69.1	57.1	85.6	87.5	82.6	84.0	86.5	90.1
23358	83.9	84.1	81.5	75.0	77.7	71.2	84.9	87.0	85.0	86.4	85.3	90.6
85282	81.2	87.3	83.1	65.7	70.4	59.6	82.1	88.1	84.4	85.2	86.5	90.3

- **Bovine astrovirus (BAstV)**의 유전체 크기는 일반적으로 6.4에서 7.3 kb로 알려져

있음. 21개의 분변 샘플 중 7개에서 BAstV RNA 시퀀스가 확인되었으며, 크기는 6,052-6,288 bp로 나타났다. 계통 분석 결과 7개 중 5개 샘플은 group 5에, 나머지 2개 샘플은 각 group 2 및 group 4에 속하는 것으로 확인되었음.

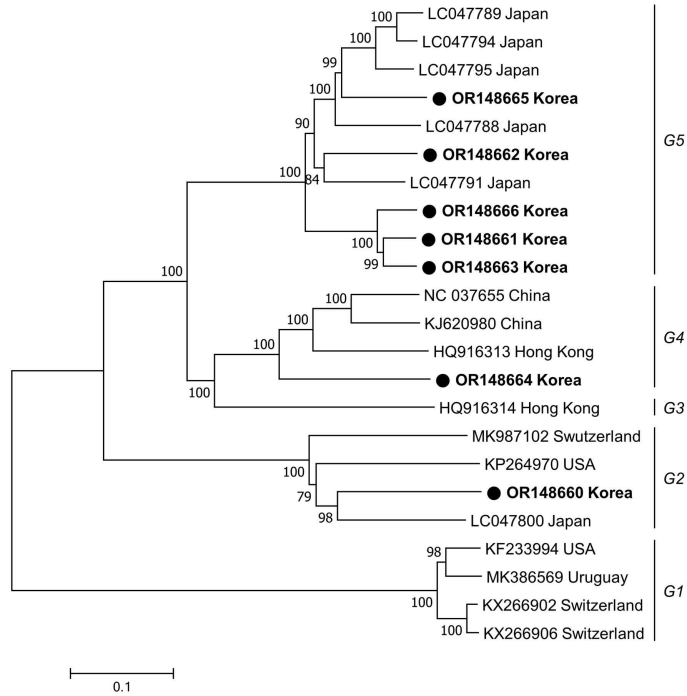


그림 47. Phylogenetic analysis of BAstV based on nearly complete genome sequences

- 염기서열 분석 결과, group 2에 속하는 1개의 샘플은 BAstV 참고 균주 염기서열 (LC047800)과 73.8% 일치하였으며, group 4에 속하는 1개 샘플은 BAstV 참고 균주 염기서열 (NC_037655)과 73.2% 일치하였으며, group 5속하는 5개 샘플은 BAstV 참고 균주 염기서열 (LC047788)과 77.6-82.9% 일치하는 것으로 나타났다.
- BAstV는 group 별로 유발하는 질환이 다른 것으로 보고되고있음. group 1의 경우, 신경증상과 관련이 되어 있고, group2는 신경, 소화기, 호흡기 증상에, group 3-5는 소화기 증상에 관련이 있는 것으로 알려져 있음 (참고문헌 38)
- 한국에서는 nonsuppurative meningoencephalitis가 관찰된 한우에서 group 1 BAstV가 관찰되었다는 보고가 있음 (참고문헌 39). 본 연구에서는 **국내 최초로 group 2-5 BAstV 의 전체 유전자 염기서열을 확보**하였고, 본 연구 결과는 앞으로 송아지 설사 병원체로서의 BAstV관련 연구 등에 기여할 것으로 생각됨.

표 22. BAstV group 2 균주 (LC047800)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)		
	Complete genome	ORF1ab	ORF2
12151	73.8	87.34	51.45
18707	47.9	-	-
53954	-	-	-
71346	49.3	-	-
73961	-	-	-
86599	48.5	-	-

NA_4_475	49.2	-	-
----------	------	---	---

-, Nucleotide similarity less than 25%.

표 23. BAstV group 4 균주 (NC_0376550)와 전체 유전자 비교 결과

Sample IDs	Nucleotide identities (%)		
	Complete genome	ORF1ab	ORF2
12151	47.4	-	-
18707	60.0	71.0	46.4
53954	60.2	71.0	46.9
71346	59.3	70.2	-
73961	73.2	88.8	49.2
86599	61.4	71.7	49.0
NA_4_475	59.6	70.6	-

-, Nucleotide similarity less than 25%.

표 24. BAstV group 5 균주 (LC047788)와 전체 유전자 비교 결과

Sample IDs	Nucleotide identities (%)		
	Complete genome	ORF1ab	ORF2
12151	47.8	-	-
18707	78.7	84.8	68.9
53954	79.3	86.6	67.1
71346	78.1	85.1	66.6
73961	60.4	71.3	-
86599	82.9	90.9	70.5
NA_4_475	77.6	84.3	66.7

-, Nucleotide similarity less than 25%.

- **Bovine enterovirus (BEV)**의 유전체 크기는 일반적으로 7.3에서 7.5 kb로 알려져 있음. 21개의 분변 샘플 중 2개에서 BEV 유전체 RNA 시퀀스가 확인되었으며, 크기는 7,365-7,398 bp로 나타났음. 계통 분석결과 2개 샘플 모두 BEV-F 균주에 속하였음. BEV F 참고 균주 염기서열 (NC_021220)과 비교를 했을 때, 각각 76.4% 및 79.8% 일치하는 것으로 확인되었음.
- BEV는 일반적으로 무증상 감염으로 알려져 있지만, 송아지 설사와 관련이 있다는 연구결과가 있음 (참고문헌 40). 본 연구결과에서는 송아지 설사 분변에서 BEV가 검출되었기 때문에 앞으로 BEV의 송아지 설사에서의 임상적의의를 확인하는 추가 연구가 필요할 것으로 판단됨.

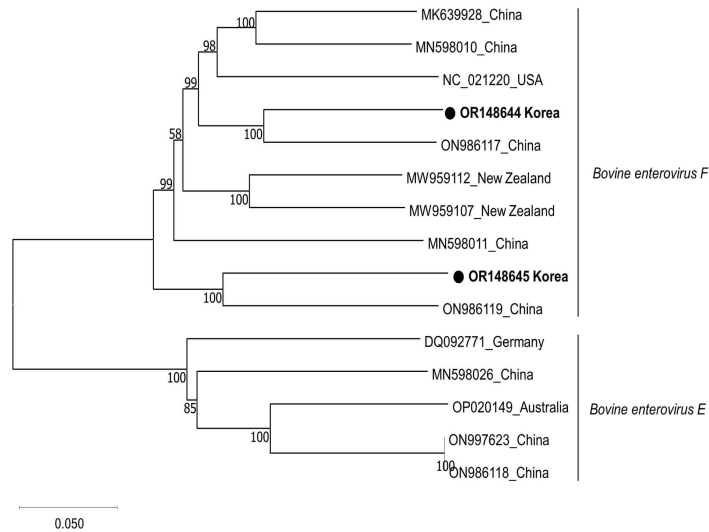


그림 48 Phylogenetic analysis of BEV based on nearly complete genome sequences

표 25. BEV F 균주 (NC_021220)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)										
	Complete genome	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3C	RdRp
18897	79.8	80.7	73.7	74.1	67.9	70.0	77.1	83.3	79.0	84.3	88.1
53954	76.4	75.4	75.0	75.0	57.7	74.0	79.1	81.0	79.0	85.4	86.5

- **Bovine Kobuvirus (BKoV)**의 유전체 크기는 일반적으로 8.2-8.4 kb으로 알려져 있음. 21개 분변 샘플 중, 7개에서 BKoV RNA가 확인되었으며, 크기는 8,293-8,441 bp로 나타났음. 계통 분석 결과 7개 중 5개 샘플이 Aichivirus B에, 나머지 2개 샘플은 Aichivirus D로 확인 되었음.
- Aichivirus B에 속하는 5개 샘플은 Aichivirus B 참고 균주 염기서열 (KT003671) 과 89.9-90.2% 동일하였으며, Aichivirus D에 속하는 2개 샘플은 Aichivirus D 참고 균주 염기서열 (LC055960)과 79.4-83.6% 동일하였음.
- BkoV는 2003년 일본에서 보고된 이후, 많은 국가에서 보고가 되었으며, 송아지 설사와 관련이 있는 것으로 알려져 있음 (참고문헌 41). 기존 한국에 분포하는 BKoV 관련 연구는 전체 염기서열이 아닌 일부 염기서열만 보고가 되었지만 (참고문헌 42), 본 연구를 통해 **국내 최초로 BKoV 전체 유전자 염기서열을 확보**하였음. 이는 앞으로 BKoV의 유전적 특성 및 다양성에 대한 연구에 큰 기여를 할 것임.

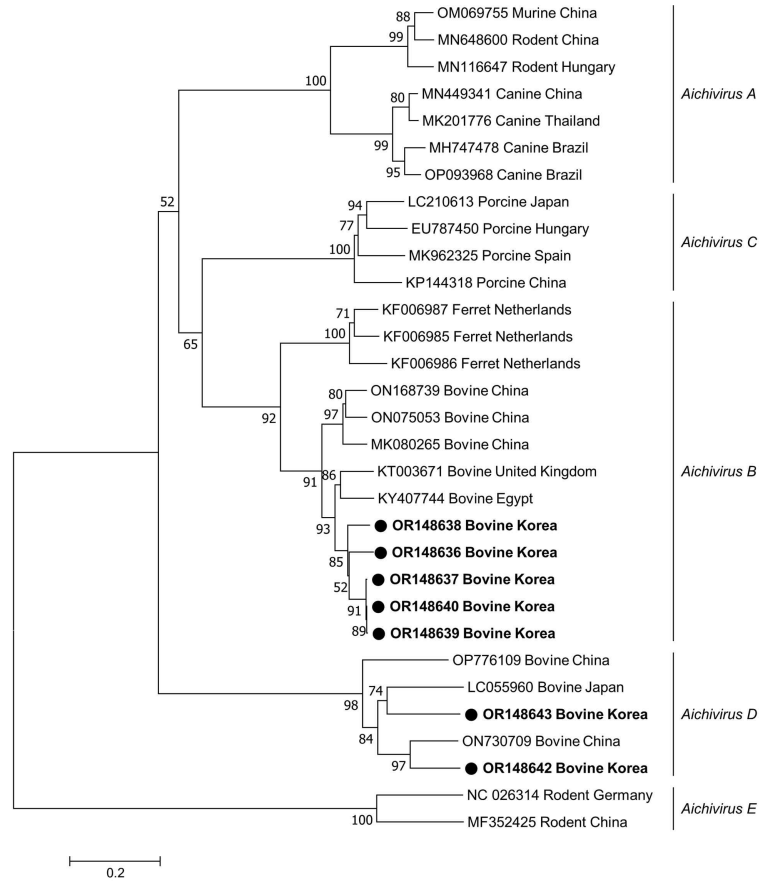


그림 49 Phylogenetic analysis of BKoV based on nearly complete genome sequences.

표 25. BKoV 균주 (Aichivirus B, KT003671)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)											
	Complete genome	L	VP0	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
00276	90.0	86.6	90.0	87.0	87.4	91.3	88.3	91.8	90.8	96.7	90.3	93.3
18897	89.9	86.5	89.1	88.6	87.3	92.5	87.7	93.2	90.1	85.6	92.5	92.3
23358	-	-	55.2	63.0	50.4	53.9	-	58.7	-	-	-	64.9
71346	90.1	86.3	88.6	88.3	86.5	92.0	87.5	92.7	92.2	96.7	91.7	92.3
85282	90.2	85.9	89.1	88.6	87.6	82.0	87.7	93.2	90.1	95.6	52.5	92.1
NA_4_47 5	90.2	86.1	89.2	88.8	87.6	92.3	87.7	93.2	90.1	95.6	92.4	92.1
53954	-	-	57.5	59.5	54.4	55.8	-	59.5	-	-	-	62.0

-, Nucleotide similarity less than 25%.

표 26. BKoV 균주 (Aichivirus D, LC055960)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)											
	Complete genome	L	VP0	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
00276	-	-	57.6	60.7	54.1	56.9	-	57.0	-	-	55.3	65.5
18897	-	-	57.2	61.9	54.2	57.9	-	58.3	-	-	56.0	65.4
23358	79.4	82.7	64.0	70.3	62.2	94.4	81.8	81.2	93.0	85.4	85.6	91.4
71346	-	-	56.3	62.0	54.1	56.0	-	57.9	-	-	56.1	65.2

85282	-	-	57.5	61.9	54.2	57.9	-	58.3	-	-	56.0	65.4
NA_4_4 75	-	-	57.37	61.9	54.2	58.2	-	58.3	-	-	55.8	65.4
53954	83.6	85.8	82.1	74.6	75.3	92.2	79.2	81.9	91.2	83.3	84.2	90.96

-, Nucleotide similarity less than 25%.

- **Bovine nebovirus (BNeV)**의 유전체 크기는 일반적으로 7.4-7.5 kb로 알려져 있음. 21개의 분변 샘플 중 1개에서 BNeV RNA (7,399 bp)가 확인되었음. 계통 분석 결과 Newbury strain에 속하는 것으로 나타났으며, 참고 균주 염기서열 (NC007916)과 81.5% 동일한 것으로 확인되었음. BNeV (Newbury strain)는 한국에서 이미 보고가 되어 있으나 (참고문헌 43). 기존 보고된 partial 염기서열을 이용하여 분석을 했을 때, 본 연구에서 확보된 염기서열과는 다른 cluster를 형성하는 것을 확인 되었음. BNeV에 관한 연구자체가 많지 않기 때문에, 앞으로 송아지 설사와 BNeV에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각됨.

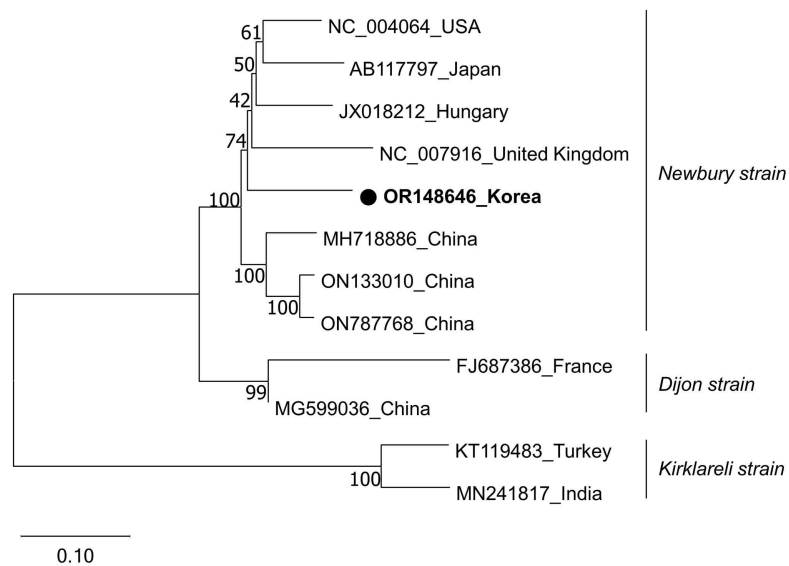


그림 50 Phylogenetic analysis of BNeV based on nearly complete genome sequences.

표 27. BCoV 균주 (NC007916)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)		
	Complete genome	polyprotein	ORF2
83561	81.5	81.6	87.5

- **Bovine norovirus (BNoV)**의 유전체 크기는 일반적으로 7.2-7.3 kb로 알려져 있음. 21개의 분변 샘플 중, 2개에서 BNoV RNA (7,273-7,307 bp)가 확인되었으며, Norovirus GIII type에 속하였음. 또한, 2개 샘플은 동일 그룹 참고 균주 염기서열 (NC_029645)과 85.8% 동일한 것으로 나타났음.
- Norovirus는 7개의 genogroup으로 나뉘지며, BNoV는 이중 GIII에 속함 (참고문헌 44) 본 연구결과는 기존 연구와 일치하는 것으로 확인되며, 앞으로 BNoV의 cross-species transmission 가능성 등에 대하여 연구하고 최종적으로는 효과적인 예방대책을 수립하는 데 기여할 것임.

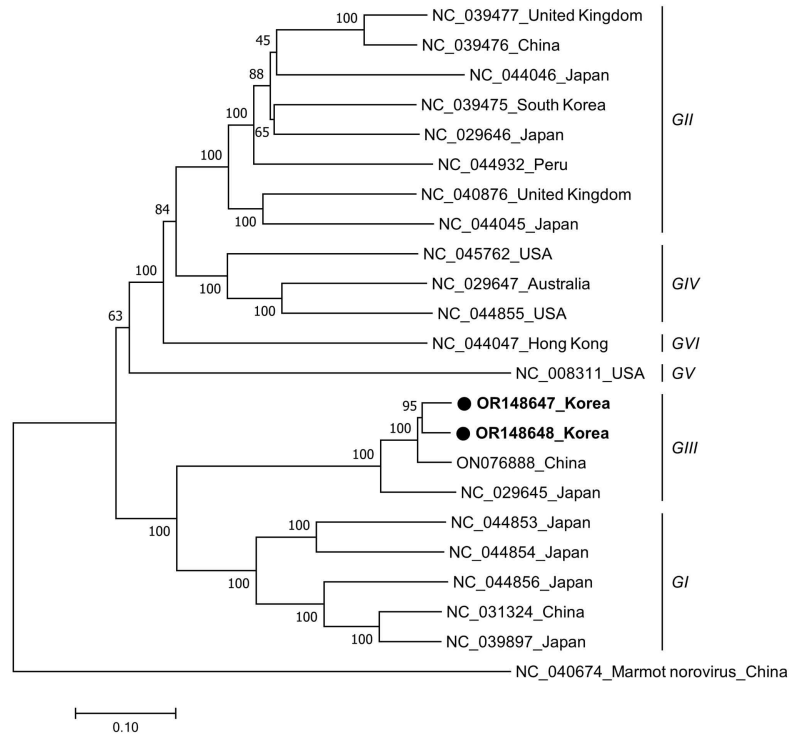


그림 51 Phylogenetic analysis of BNoV based on nearly complete genome sequences

표 28. BNoV 균주 (NC_029645)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)								
	Complete genome	p48	NTPase	p22	Vpg	Pro	RdRp	VP1	VP2
73961	85.8	84.1	85.3	85.3	87.4	87.3	88.1	89.9	87.0
83561	85.8	83.5	85.8	85.1	86.1	87.5	88	85.9	85.3

- **Bovine parechovirus (BParV)**의 유전체 크기는 일반적으로 7.7-7.8 kb로 알려져 있음. 21개의 분변 샘플 중 1개 샘플에서 BParV RNA (7,809 bp)가 확인되었으며, Parechovirus A-F에 속하지 않았지만, 일본에서 분리된 균주들과 cluster를 형성 하였음. 또한, 참고 균주 염기서열(BR001751)와 86.3% 동일하였음.
- BParV는 2021년에 처음으로 보고가 되었음. BParV가 송아지 설사에 대한 역할에 대하여 많은 보고가 되어 있지 않으나, 설사 분변 및 소화기관에서 발견되어, 송아지 설사 병원체로서의 가능성이 있는 것으로 여겨지고 있음. 우리나라에서도 BParV가 존재하는 것을 보고되었음 (참고문헌 45-46).
- 본 연구 결과는 앞으로 BParV에 대한 역학 조사등의 추가연구를 하는데 많은 도움이 될 것으로 예상됨.

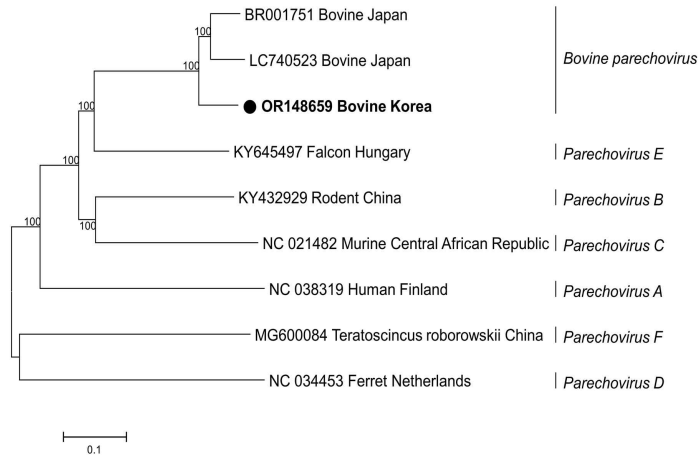


그림 52 Phylogenetic analysis of BParV based on nearly complete genome sequences

표 29. BParV 균주 (BR0001751)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)	
	Complete genome	Polyprotein
18897	86.3	88.4

- **Bovine torovirus (BToV)**의 유전체 크기는 27.9-28.5 kb로 알려져 있으며, 21개 분변 샘플 중 2개에서 BToV RNA (27,657 bp, 28,423 bp)가 확인되었음. 계통분석 결과, 확인된 2개의 샘플은 중국에서 분리된 균주 (NM073059)와 가장 가까운 것으로, 캐나다 분리 균주 (AY427798)와는 먼 것으로 확인되었음. 또한, 2개의 샘플은 캐나다 분리 참고 균주 염기서열 (AY427798)과 80.3%, 82.1% 동일한 것으로 나타났다.
- BToV의 경우, 주로 송아지 설사 관련 병원체로 많이 보고되고 있음 (참고문헌 24). 본 연구에서 확인된 BToV는 중국과 일본 유래 BToV 균주와 가장 밀접한 관련이 있으며 캐나다 유래 BToV 균주와는 구별이 되었음. 이는 우리나라의 이전 보고와 일치함 (참고문헌 25)

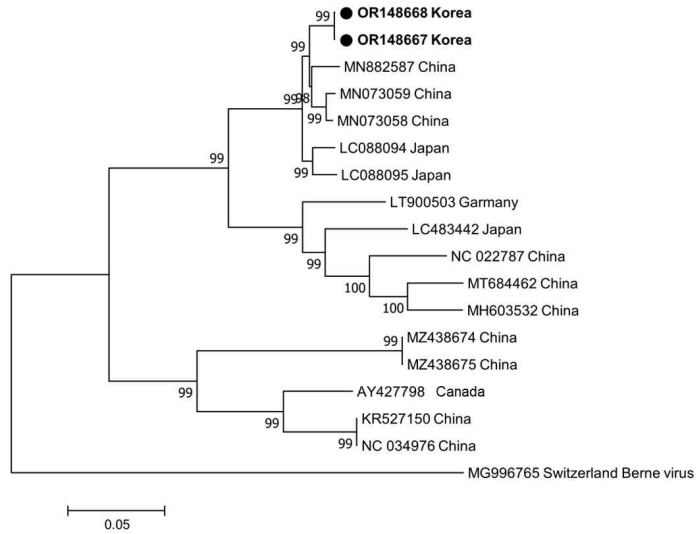


그림 53 Phylogenetic analysis of BToV based on nearly complete genome sequences

표 30. BToV 균주 (AY427798)와 전체 유전자 비교 결과

Sample	Nucleotide identity (%)					
	Complete genome	pollab	S	M	HE	N
12151	80.3	78.9	95.5	94.3	87.1	69.8
37284	82.1	78.9	95.5	94.3	87.1	69.8

- 임상 샘플에서 병원체를 진단하는 전통적인 방법은 잠재적 감염 요인에 대한 사전 지식이 필요하다는 한계가 있음. 이러한 사전 지식 없이는 진단이 불가능하나, 차세대염기서열분석법 (Next-Generation Sequencing, NGS)는 이러한 제한을 극복하는 데 중요한 도구로 각광받고 있음. NGS의 높은 비용 및 실험 및 분석 중의 잠재적 오류와 같은 여러 어려움에도 불구하고 NGS를 이용한 신/변종 병원체를 발견/분석하는 연구들은 계속해서 진행되고 있음. 본 연구에서는 **최신 NGS 기술을 사용하여 송아지 설사와 관련된 10가지 새로운 원인 바이러스를 식별하였음. 확인된 10가지 바이러스들은 기존에 우리나라에서 보고되지 않았던 신규 바이러스 (CSpV1, BooV, Hunnivirus) 또는, 기존에 보고되었으나 많은 연구가 진행되지 않은 neglected 병원체 임.** 이는 앞으로 송아지 설사 관련 병원체 진단에서 NGS의 유용성 및 기존 병원체 이외에도 본 연구에서 확인된 병원체들을 고려할 필요가 있다는 것을 의미함.
- 본 연구결과는 앞으로 우리나라에서 송아지 설사관련 병원체에 대한 모니터 및 효과적인 대응 전략 개발에 유용하게 이용될 수 있음.

■ 국내 미보고 소 호흡기 바이러스 (BRAV, BRBV) 국내/인도 현황 및 분자유전학 특성 조사

- NGS를 이용한 확인된 국내에 보고되지 않았던 소 호흡기 질병과 관련된 바이러스인 BRAV 및 BRBV에 대한 분포 및 유전적 특성을 확인하고자 하여 다음과 같이 연구를 진행하였음.
- 기존 확보된 소 nasal swab 샘플 중, 가용 가능한 샘플을 활용하여 real time RT-PCR법 (참고문헌 47)을 이용하여 검사를 수행하였음.
- Real time RT-PCR 양성 샘플들은 분자적유전적 특성을 규명하기 위하여 NCBI 데이터베이스에 등록된 BRAV 및 BRBV의 3D pol 유전자의 염기서열 비교를 통해, 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하여 신규 프라이머를 제작하여 수행하였음.

표 31. BRAV 및 BRVB 검출 및 시퀀싱 프라이머

Target Gene	Virus	Primer name	Amplicon Size	Sequence	Modif (5')	Modif (3')	Reference	
3D Pol	BRAV	F	171	CACCTGAACTATGGACTT GG	HEX	BHQ-1	47	
		R		CACGGCCTCAATCATCTG				
		P	GACGTGGACTGGCACCAG TTTGC					
		Seq-F	416	GRG TGA CTA YTC ACT CAT TGC				자체제작
		Seq-R		GAC ATT TTG TGT ACC CAY CTC				
	BRBV	F	112	AACGCGATTGTGTCCTAG GG	Cy5.5	BHQ-1	47	
		R		GCCACTGAGGTTAGCTTC TC				
		P	CTGTCCTTTGCACGGCGT GG					
		Seq-F	386	RTG TGC TGC AAC CAG CAT				자체제작
		Seq-R		GCC ACA GAA ACC AAC TTC TC				

- 국내 13개 농장 506개 nasal swab 샘플을 이용하여 Real time RT-PCR을 수행한 결과, **BRAV는 83개 샘플이 양성 (16.4%)으로, BRVB는 161개 샘플이 양성 (31.8%)로 판정**되었음.

표 32. 국내 nasal swab 샘플을 이용한 BRAV 및 BRVB 검출 결과

농장	지역	검사 샘플 수	BRAV 양성 샘플 수	BRVB 양성 샘플 수
1	경기	9	0	0
2	경기	13	0	0
3	경기	70	0	23
4	충남	6	0	3
5	충남	100	41	27
6	충남	33	1	17
7	충남	12	4	5
8	충남	14	2	14
9	충남	119	2	43
10	전북	50	0	3
11	전북	71	28	18
12	경남	5	5	4
13	경남	4	0	4
합계		506	83 (16.4%)	161 (31.8%)

- 또한, **BRAV는 13개 농장 중 7개 농장에서 (53.8%), BRVB는 10개 농장에서 (76.9%) 검출되었음.** 경기지역 농장 3곳에서는 BRAV 및 BRVB가 모두 검출되지 않았음. 또한, **대부분 농장에서 BRAV 및 BRVB가 복합감염이 되어 있는 것으로 확인되었음.** **국내에서 BRAV 및 BRVB가 예상보다 많이 퍼져 있다는 것을 의미함.** 또한, 기존에 평가한 6종의 호흡기 병원체들과 복합감염을 확인하였음.
- 그 결과, 총 11개 BRAV 및 BRVB 양성 농장 중, **BRAV+BRVB 복합감염 농장이 4개 농장 (36.4%)으로 가장 높은 양성율을 나타내었으며,** BRAV 또는 BRVB 단독감염 농장은 낮은 것으로 확인되었음. 또한, **다른 병원체들과 복합감염된 농장들은 총 6개 농장 (54.5%)으로 관찰되었음.**

표 33. 국내 호흡기 병원체 8종 농장 감염 현황 (BRAV 및 BRVB 양성 농장 기반)

병원체	양성 농장 수 (총 11개)
BRAV	-
BRVB	1
BRAV+BRVB	4
BRVB+BVDV1+BVDV2	3
BRAV+BRVB+BRSV	1
BRAV+BRVB+BVDV1+BVDV2	2

- 인도에서의 BRAV 및 BRVB의 현황을 확인하기 위해, 10개의 농장 500개 샘플을 대상으로 Real time RT-PCR을 수행한 결과, **BRAV는 19개 샘플이 양성 (3.8%)으로, BRVB는 4개 샘플이 양성 (0.8%)로 판정되었음.** 또한, **BRAV는 10개 농장 중 6개 농장에서 (60.0%), BRVB는 2개 농장에서 (20%) 검출되었음.** 한국과는 다르게 인도에서의 BRAV 및 BRVB는 낮은 양성율을 보이며, 특히 BRVB의 양성율이 높은 한국과는 다르게 BRAV의 양성률이 높게 나타났음.

표 34. 인도 nasal swab 샘플을 이용한 BRAV 및 BRVB 검출 결과

농장	지역	검사 샘플 수	BRAV 양성 샘플 수	BRVB 양성 샘플 수
1	Haryana	50	1	0
2	Haryana	50	4	0
3	Haryana	50	0	0
4	Punjab	50	1	0
5	Punjab	50	6	2
6	Haryana	50	0	0
7	Haryana	50	6	2
8	Haryana	50	1	0
9	Haryana	50	0	0
10	Punjab	50	0	0
합계		500	19 (3.8%)	4 (0.8%)

- 총 6개 BRAV 및 BRBV 양성 농장 중, **복합감염된 농장들은 총 5 농장 (83.3%)**으로 관찰되었음. 이는 한국과 마찬가지로 BRAV 및 BRVB는 단독감염보다 다른 호흡기 바이러스 병원체와 같이 복합감염 형태로 나타난다는 것을 의미함.

표 35. 인도 호흡기 병원체 8종 농장 감염 현황 (BRAV 및 BRBV 양성 농장 기반)

병원체	양성 농장 수 (총 6개)
BRAV	1 (16.7%)
BRAV+BVDV1	1 (16.7%)
BRAV+BVDV2	1 (16.7%)
BRAV+BRBV+BVDV1	1 (16.7%)
BRAV+BVDV1+IDV	1 (16.7%)
BRAV+BRBV+BVDV1+BVDV2	1 (16.7%)

- Real time RT-PCR에서 양성으로 확인된 샘플들을 이용하여 3D pol 유전자 염기서열 분석통해 BRBV 및 BRBV의 분자유전학적 특성을 분석하였음.
- BRAV의 경우, 총 47개의 샘플 (국내 샘플 39개, 인도 8개)에서 유전자 염기서열 분석이 되었음. 그. **분석된 BRAV 샘플들은 5개의 국내 샘플을 제외하면 모두 BRAV 1형이며, 나머지 5개의 국내 샘플은 BRAV 2형 균주로 확인**되었음.
- 또한, **인도 BRAV**의 경우, BRAV1에 속하지만, **국내 BRAV와 달리 별도의 cluster**를 형성하는 것을 확인할 수 있었음.

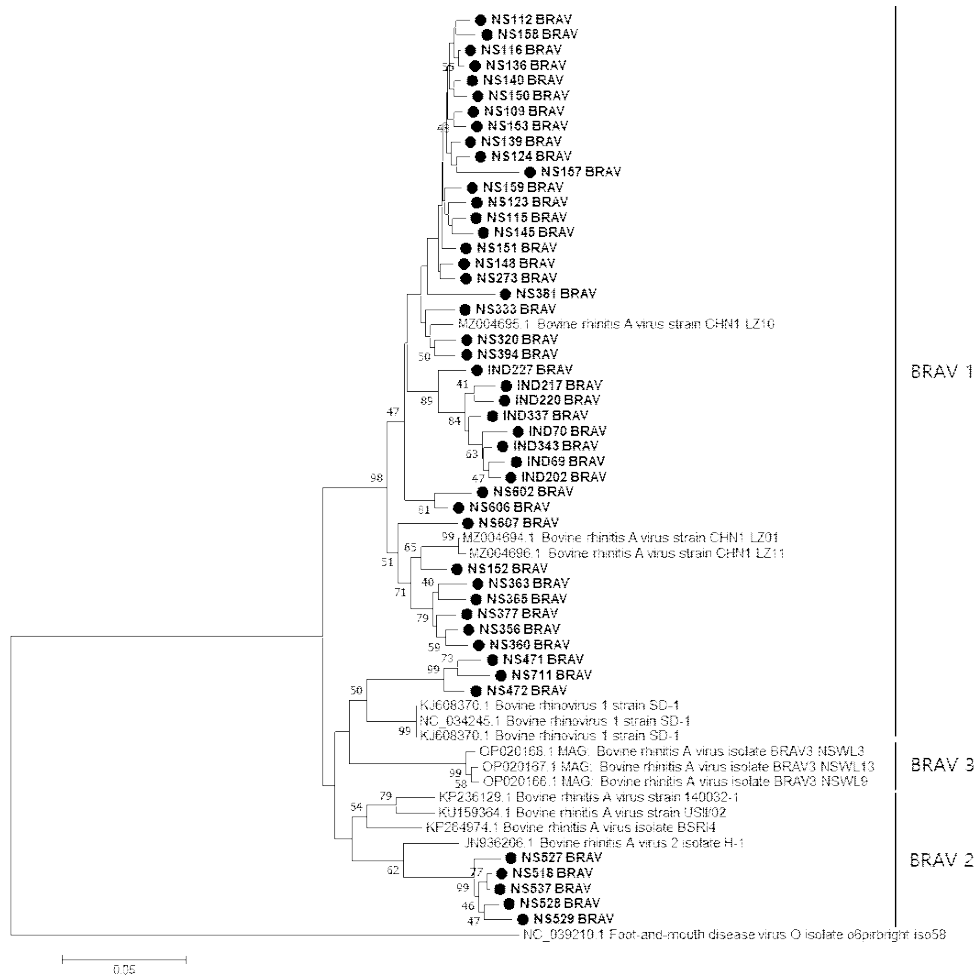


그림 54 Phylogenetic tree of BRAV based on 3D pol gene

- BRBV의 경우, 총 59개의 국내 샘플에서 유전자 염기서열 분석이 되었음. 분석된 BRBV 샘플들은 BRBV 1 (1개), BRBV 2 (46개), BRBV 4형 (12개)으로 확인되었음. 다만, BRBV2는 크게 2개의 cluster를 형성하는 것으로 확인되었음.

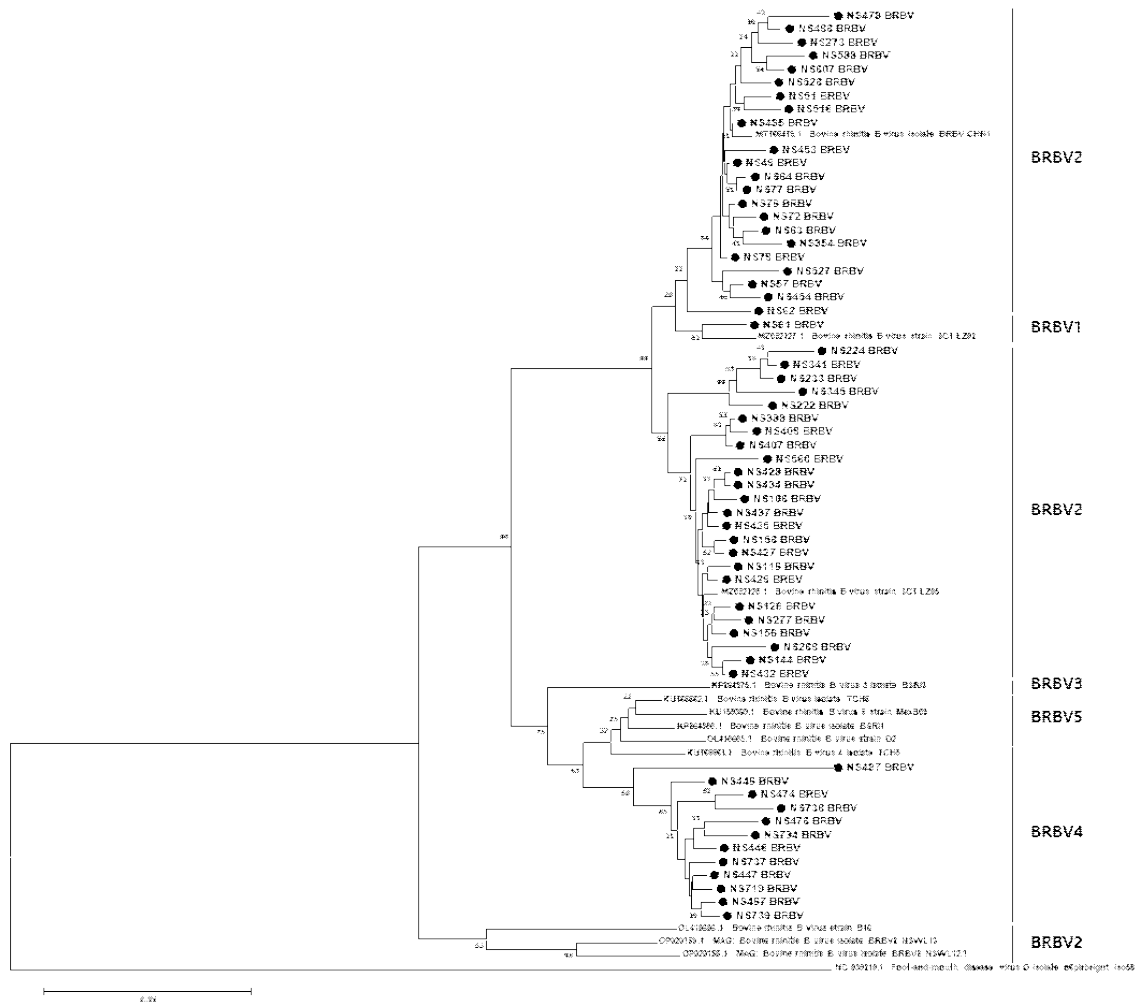


그림 55 Phylogenetic tree of BRBV based on 3D pol gene

- 3D pol 유전자를 이용한 분석 시, 위에서 기술한 NGS를 이용한 complete genome sequences 가 확인된 샘플 결과와 같이 BRAV 1형 및 BRAV 2형만 검출되었음. 이는 3D pol 유전자를 이용한 BRAV 분자유전학 특성분석만 해도 complete genome sequence를 통한 특성분석 결과와 같다는 것을 의미함. 반면에 BRBV의 경우, NGS에서는 BRBV 1형, 2형, 3형이 확인되었지만, 3D pol 유전자로 분석했을 때에는 BRBV 3형은 검출되지 않았고, BRBV 4형이 확인되었음. 이는 3D pol 유전자의 특성에 의한 것으로 추정됨.
- BRAV 및 BRBV는 지금까지 국내에서 neglected 소 호흡기 병원체로 생각되어, 발생 현황 및 특성이 전혀 연구되지 않았음. 하지만, 본 연구를 통해 그동안 **우리나라에서 보고되지 않았던 BRAV 및 BRBV를 NGS를 통해 그 존재를 확인**하였고, targeted assay를 통해, 한국 및 인도의 nasal swab 샘플을 이용하여, **BRAV 및 BRBV의 현황을 파악하였으며, 분자유전학적 특성도 규명**하였음.
- BRDC의 정확한 원인체는 여전히 불확실하지만, 다양한 스트레스 요소의 결합이 바이러스 및 세균 감염을 유발하여 BRDC로 발전할 수 있다고 알려져 있음. BRAV 및 BRBV가 그 중 하나일 것으로 여겨지지만, BRDC 발병에 어떤 역할을 하는지 정확히 밝혀지지 않아 발병기전에 관한 추가적인 연구 및 국내 monitoring에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 생각됨.

- **국내 미보고 송아지 설사관련 바이러스 (CSpV1) 국내 분포 및 분자유전학 특성 조사**
 - NGS를 이용한 확인된 국내에 보고되지 않았던 송아지 설사관련 바이러스인 CSpV1에 대하여 분포 및 유전적 특성을 확인하고자 하여 다음과 같이 연구를 진행하였음.
 - 생후 60일 미만의 한우 송아지의 설사변 140개 (C.parvum 양성: 70개, C.parvum 음성: 70개)을 이용하여 유전자를 추출한 후, CSpV1의 RdRP 유전자를 증폭하여, CSpV1을 검출하였음 (참고문헌 48).
 - 그 결과, 그 결과 140개 샘플 중 28개 샘플에서 CSpV1 양성으로 판정 (20% 양성율) 되었으며, C.parvum 감염에 따른 **CSpV1 양성율은 C.parvum 양성 샘플에서 31.4% (70개 중 22개)**, C.parvum 음성 샘플에서 8.6% (70개 중 6개)로 나타나 **CSpV1와 C.parvum간 연관성이 있는 것으로 확인되었음.**

표 36. 실험에 사용된 분변 샘플과 CSpV1 PCR 검사 결과

농장	지역	샘플 수	CSpV1 양성샘플 수 (%)		
			<i>C. parvum</i> 양성	<i>C. parvum</i> 음성	합계
1	경기	14	3 (42.9)	1 (14.3)	4 (28.6)
2		6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
3		42	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
4		2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
5	충남	28	7 (50.0)	1 (7.1)	8 (28.6)
6		4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
7		6	2 (66.7)	0 (0.0)	2 (33.3)
8		2	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (50.0)
9		8	3 (75.0)	0 (0.0)	3 (37.5)
10	전북	18	5 (55.6)	4 (44.4)	9 (50.0)
11		2	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (50.0)
12		4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
13	경남	4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	총합	140	22 (31.4)	6 (8.6)	28 (20.0)

- 또한, 확보한 28개의 CSpV1의 DNA 염기서열은 미국 NCBI에 등록하였음 (Accession no: OR402848 - OR402875). 28개 CSpV1 RdRP유전자의 유사성은 98.3-100%로 기존 해외연구를 통해 보고된 참고 염기서열 유사성 (미국: 95.6-96.5%, 중국: 95.5-96.4%, 일본: 94.-96.8%) 보다 높을 뿐만 아니라, **동일한 농장에서 검출된 CSpV1은 같은 유전자 군집을 이루는 것으로 나타남.** 이 연구 결과는 이전 연구결과와 일치하면서도 특이한 양상을 나타내고 있음. 일본에서 발견된 CSpV1의 RdRp 유전자가 지리적 분포를 기반으로 특정한 군집을 형성한다는 이전의 연구결과와 일치함(참고문헌 49). 이러한 **군집화 패턴은 CSpV1이 C.parvum을 모니터링하는 데 유용하게 활용될 수** 있다는 가능성을 시사함. C.Parvum을 진단하거나 모니터링하는 데 전통적인 방법으로는 어려움이 있는데, 이는 Oocyst 벽의 구조 때문임 (참고문헌 50). 이에 반해, CSpV1은 이러한 어려움을 극복하고 C.parvum의 역학 연구에 기여할 수 있는 유용한 도구로 간주될 수 있음. 이러한 결과는 **CSpV1이 C.parvum의 유전체 및 역학 연구에 적합한 대안으로** 간주될 수 있음을 시사하고 있음.

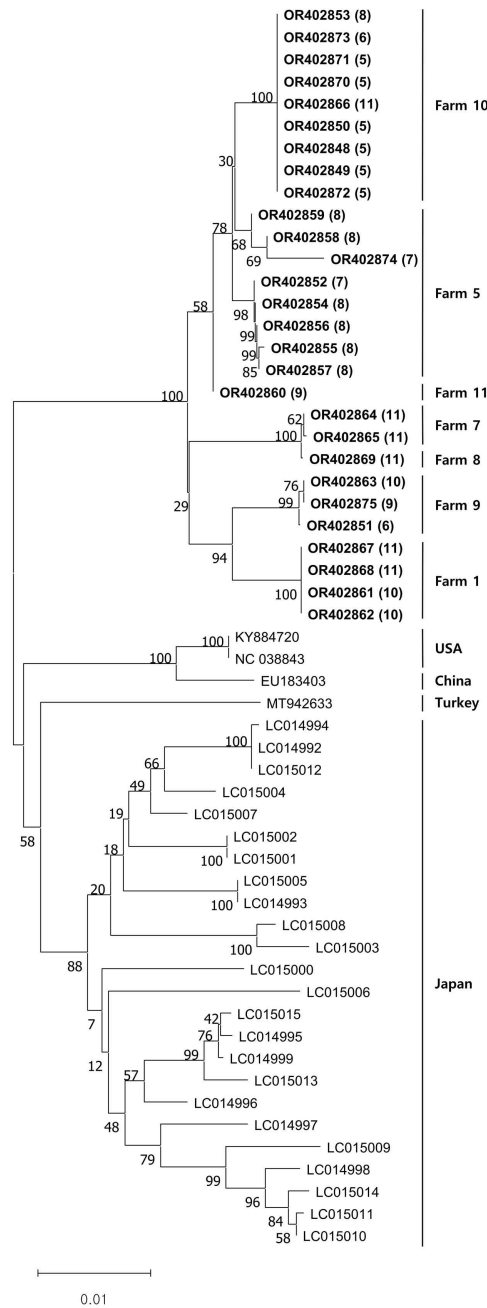
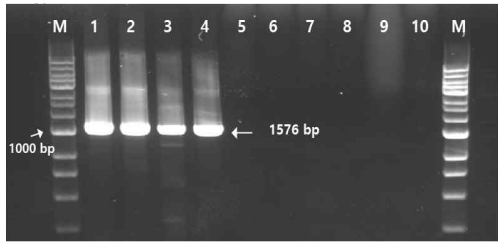


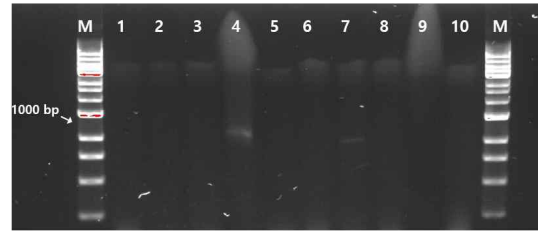
그림 56 Phylogenetic tree of CSpV1 based on RdRP gene: () 샘플링한 달

- 우리나라에서는 *C. parvum*에 의한 송아지설사가 많은 문제를 유발하는 것으로 알려져 있으나, 공생 바이러스인 CSpV1에 대한 발생 현황 및 특성이 전혀 연구되지 않았음. 하지만, 본 연구를 통해 그동안 우리나라에서 보고되지 않았던 CSpV1을 NGS를 통해 그 존재를 확인하였고, targeted assay를 통해, 분변 샘플을 이용하여, CSpV1와 *C. parvum*의 연관성, 현황을 파악하였으며, 분자 유전학적 특성도 규명하였음. 앞으로, *parvum*과의 연관성 규명, 및 국내 monitoring에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각됨.
- 본 연구결과는 Veterinary Science에 게재되었음 (Vet. Sci. 2023, 10(11), 633; <https://doi.org/10.3390/vetsci10110633>)



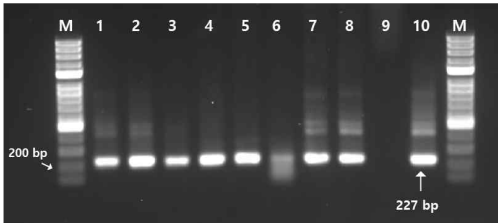
M: DNA ladder (1000 bp)
 1: 843 6: 886
 2: 852 7: 909
 3: 855 8: 1006
 4: 871 9: 1011
 5: 880 10: 1015

그림 58 기존 CSpV1 RdRP 유전자 검출 프라이머를 이용한 송아지 설사샘플에 존재하는 CSpV1 검출 결과



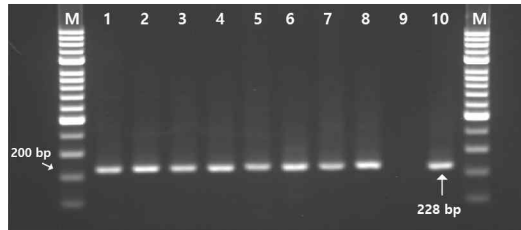
M: DNA ladder (1000 bp)
 1: 843 6: 886
 2: 852 7: 909
 3: 855 8: 1006
 4: 871 9: 1011
 5: 880 10: 1015

그림 59 기존 CSpV1 Capsid 유전자 검출 프라이머를 이용한 송아지 설사샘플에 존재하는 CSpV1 검출결과



M: DNA ladder (100 bp)
 1: 843 6: 886
 2: 852 7: 909
 3: 855 8: 1006
 4: 871 9: 1011
 5: 880 10: 1015

그림 60 신규 CSpV1 프라이머 set 1 (RdRP)를 이용한 소 설사샘플에 존재하는 CSpV1 검출 결과



M: DNA ladder (100 bp)
 1: 843 6: 886
 2: 852 7: 909
 3: 855 8: 1006
 4: 871 9: 1011
 5: 880 10: 1015

그림 61 신규 CSpV1 프라이머 set 2 (Capsid)를 이용한 소 설사샘플에 존재하는 CSpV1 검출 결과

- 본 연구결과는 “소 유래 작은와포자충 바이러스 1 진단용 프라이머 세트, 조성물 진단 키트 및 진단 방법”으로 2023년 9월 특허 출원이 되었음.

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2023.09.24
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2023P0083)
 출원 번호 10-2023-0127587 (접수번호 1-1-2023-1057739-56)
 (DAS접근코드F5D4)
 출원인 명칭 한국축산데이터 주식회사 농업회사법인(1-2018-066211-2)
 대리인 성명 김건우(9-2003-000483-2)
 발명자 성명 강정원 조영미 신승욱
 발명의 명칭 소 유래 작은와포자충 바이러스 1 진단용 프라이머 세트, 조성물, 진단 키트 및 진단 방법

특 허 청 장

■ 국내 미보고 송아지 설사관련 바이러스 (BooV) 국내 분포 및 유전적 특성 조사

- NGS를 이용한 확인된 국내에 보고되지 않았던 송아지 설사관련 바이러스인 BooV에 대하여 분포 및 유전적 특성을 확인하고자 하여 다음과 같이 연구를 진행하였음.

- 13개 한우농가에서 생후 60일 미만의 한우 송아지의 설사변 70개를 무작위로 선택한 다음 BooV 및 송아지 설사와 관련된 병원체인 BRV, BCV, BVDV, C.parvum, Giardia spp., 및 Eimeria spp.에 대해 검사를 수행하였음. BooV 검출 프라이머는 본 연구를 위해서 직접 설계하여 사용하였음.
- 송아지 설사와 관련된 각 병원체의 양성진단율은 **BooV (25/70, 35.7%)가 가장 높게 나타났으며**, BRV (13/70, 18.6%), BVDV 2 (4/70, 5.7%), BCV (3/70, 4.3%), BVDV1 (1/70, 1.4%)로 확인되었음. C. parvum, Giardia spp., Eimeria spp.는 검출되지 않았음. 또한, 13개농장 중, 10개의 농장에서 BooV가 검출되어 76.9%로 가장 높은 감염 또한, **BooV는 13개 농장 중 10개 농장에서 (76.9%)에서 검출이 되어** 가장 높은 양성율을 나타냈었음.

표 40 BooV를 비롯한 송아지 설사 관련 병원체 검출 결과

Pathogens	Number of positive calves (positive rates, %)	Number of positive farms (positive rates, %)
Bovine rotavirus	13 (18.6)	8 (61.5)
Bovine coronavirus	3 (4.3)	2 (15.4)
Bovine boosepivirus	25 (35.7)	10 (76.9)
Bovine viral diarrhea virus type 1	1 (1.4)	1 (7.7)
Bovine viral diarrhea virus type 2	4 (5.7)	3 (23.1)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Giardia</i> spp.	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Eimeria</i> spp.	0 (0.0)	0 (0.0)

- BooV와 다른 병원체 간의 관계를 확인하기 위해 BooV 및 다른 병원체의 동시 감염률을 확인해본 결과, 25개의 BooV 양성 대변 샘플 중 20개 (80.0%)은 BooV 단독 감염이었으며, 4개 (16.0%)는 BRV와 1개는 BVDV2 (4.0%)와 동시 감염되었음.

표 41 BooV 감염형태 (70개 분변 샘플 중 25개의 BooV 양성샘플 중)

Pathogens	Number of positive calves	Prevalence (%)
BooV	20	80.0
BooV+BRV	4	16.0
BooV+BVDV2	1	4.0
Total	25	100.0

- BooV의 분자적 특성을 확인하기 위해 25개의 BooV PCR product를 염기서열 분석을 수행하였음. 얻어진 모든 염기서열은 NCBI GenBank 데이터베이스에 등록되었음 (Accession no: OR467506-OR467530). 계통분석 결과, 25개 모든 샘플은 BooV B로 확인되었으며, 83-100% 동일한 것으로 나타났음.

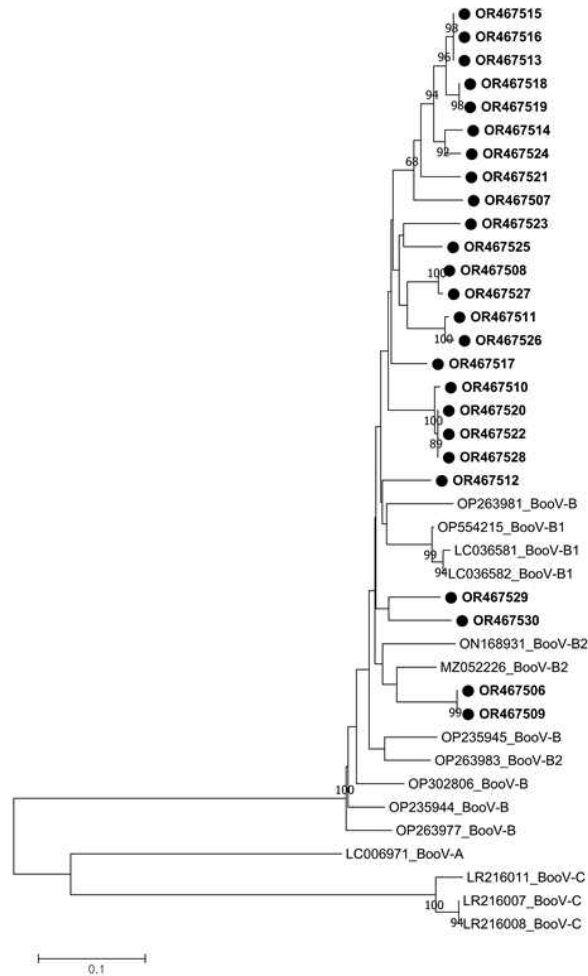


그림 63 Phylogenetic tree of BooV

- 이 연구에서는 송아지 설사 관련된 병원체 중에서 BooV가 가장 높은 양성을 (35.7%) 및 대부분의 농장 (76.9%)에서 감염된 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 대부분의 BooV 감염 사례가 단일 감염 (80%)이었음. 제한된 샘플 수를 고려하더라도, 대부분의 BooV 양성 케이스가 단독 감염되었다는 사실은 우리나라에서 BooV가 송아지 설사와 관련 중요한 병원체일 가능성을 의미하고 있음. 본 연구에서는 13개 농장 70개 샘플을 이용하여 BooV에 대한 연구를 진행하였지만, 앞으로 더 많은 농장, 더 많은 분변샘플을 이용하여 연구를 진행하여 우리나라 송아지 설사에서의 BooV의 현황을 파악할 필요가 있다는 것을 의미함. 또한, BooV가 송아지 설사를 유발하는 기전 및 임상적 의미에 관한 많은 연구가 필요하다는 것을 시사하고 있음.

■ 국내 미보고 송아지 설사관련 바이러스 (BooV) 신규 진단법 개발

- BooV 진단을 위해서 NGS 연구로 확보한 BooV 전장유전체 염기서열과 NCBI 데이터베이스에 등록된 Boosepivirus 전장유전체의 비교를 통해, 염기서열 변화가 적은 부위를 분석하고 Boosepivirus를 진단할 수 있는 부위 특이적인 primer를 제작하였음 (표 2). Primer는 2가지 Forward primer 와 1가지 Reverse primer를 조합하여 사용할 수 있도록 설계하였음. 이는 BooV F1-BooVR1 primer를 이용한 PCR에 의하여 검출이 되지 않았을 경우에는 해당 증폭산물 (BooV F1-BooV R1 primer를 이용한 유전자 증폭 산물)을 template로 이용하여 BooV F2-BooV R1을 프라이머를 사용한 semi-nested PCR을 수행할 수 있도록 설계하였음.
- 설계한 진단법의 평가를 위하여 10개의 송아지 설사 분변 샘플을 이용해서 진단을

수행한 결과, 1차 PCR (BooV F1-BooV R1) 결과 10개중 8개 샘플에서 검출이 되었 으며 (그림 64), 검출이 되지 않은 2개의 샘플을 2차 semi-nested PCR (BooV F2-BooV R1)을 수행한 결과, 2개 샘플 모두 검출 되었음(그림 65). 본 연구를 통 해, 개발된 신규 BooV 진단법은 송아지 설사 병원체인 BooV를 효과적으로 진단할 수 있지만 아니라, 추가연구에 이용될 수 있을 것으로 판단됨.

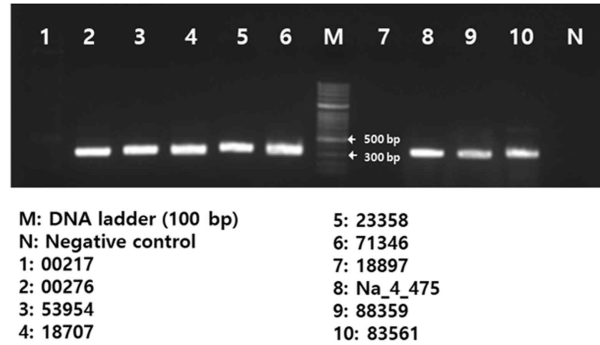


그림 64 BooV 진단 1차 PCR 결과

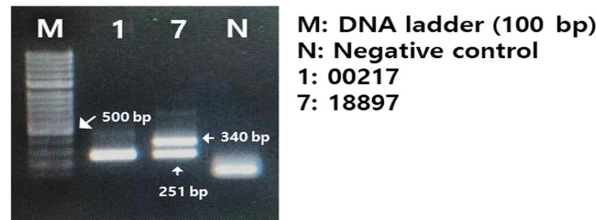


그림 65 BooV 2차 PCR (Semi-nested PCR)

- 본 연구결과는 “소 유래 부세피바이러스 진단용 프라이머 세트, 진단 키트 및 진단 방법”으로 2023년 9월 특허 출원이 되었음

관인생략

출원번호통지서

출원 일자 2023.09.27
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2023P0084)
 출원 번호 10-2023-0130691 (접수번호 1-1-2023-1078568-82)
 (DAS접근코드68FC)
 출원인 명칭 한국축산데이터 주식회사 농업회사법인(1-2018-066211-2)
 대리인 성명 김건우(9-2003-000483-2)
 발명자 성명 강정원 조영미 신승욱
 발명의 명칭 소 유래 부세피바이러스 진단용 프라이머 세트, 진단 키트 및 진단 방법

특 허 청 장

그림 66 BooV 진단법 특허출원번호 통지서

■ 인도 추가 네트워크 구축 진행 (DUASU 수의대)

- 본 과제를 통해 얻어진 결과들을 바탕으로 인도 현지 네트워크 확장을 위하여 인도 DUVASU 수의과대학 (Pandit Deen Dayal Upadhyaya pashu Chikitsa Vigyan Vishwavidyalaya Evam Go Anusandhan Sansthan)과 미팅을 진행하였음.
- DUVASU 수의과대학의 경우, 인도 농가에서도 체계적인 관리 프로그램의 필요성을 인식하고 있는 상태이며, 특히 송아지 설사와 관련된 부분에 대하여 많은 관심을 보였고, LOI를 보내온 상태임.

- 인도 역시, BRV등 주요한 병원체 및 CSpV1 등의 본 연구팀이 확인한 neglected 병원체등 다양한 병원체가 송아지 설사에 관여할 가능성이 높고, 이들 병원체들이 국내 유입 가능성도 있기 때문에 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각됨. 또한, C.parvum의 공생 바이러스인 CSpV1의 경우 인도 내 소 C.parvum 감염에 대한 보고가 다수 있으며, C.parvum의 경우 사람도 감염될 수 있는 병원체이기 때문에 이에 대한 유병율을 확인하고 검출방법을 확립하는 것이 원헬스 측면으로도 의미가 있을 것으로 생각됨.

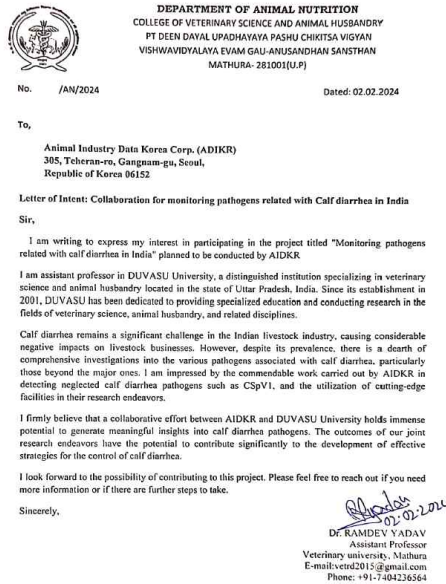


그림 67 인도 DUVASU 수의대의 LOI

나. 고찰 및 향후 계획

- 본 연구팀은 인도 현지 네트워크를 성공적으로 구축하여 그동안 연구가 많이 되지 않았던 인도 및 한국에서의 소 호흡기 병원체에 대한 역학조사를 실시하여, 앞으로 소 호흡기 질병관리에 대한 방향성을 제시하였음.
- 본 연구에서는 한국 및 인도 소 호흡기 샘플 및 한국 분변 샘플을 확보하고, 기존에 알려진 소 호흡기 및 설사관련 병원체가 검출되지 않은 샘플들을 이용하여, 소 호흡기 관련 신규바이러스 2종 (BRV, BRAV) 및 송아지 설사관련 신규바이러스 2종 (CSpV1, BooV)를 발견하였을 뿐만 아니라, 기존에 검사를 수행하지 않았던 neglected 바이러스들을 발견하여 NGS를 이용한 병원체 진단의 유용성을 제시하였음.
- 현재 한국축산데이터는 세계 최대의 소 사육국가인 인도 시장 진출하고 있음. 인도 자회사를 통해 축우 사료 공급 및 대상 사업을 진행하고 있으며, 현지 네트워크를 확장하고 있음. 본 과제를 통해 개발, 기술 이전된 소 병원체 진단법들을 활용하여, 현지 네트워크 확장 및 축우 대상 헬스케어 사업을 확대할 예정임.
- 또한, 본 과제를 통해 발견된 신규 병원체에 관련 진단키트 및 백신개발등의 산업화를 위한 협업을 추진하고자 함.

다. 참고문헌

1. Letellier, C., and P. Kerkhofs. "Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus." Journal of Virological Methods 114.1 (2003): 21-27.

2. Willoughby, K., Thomson, K., Maley, M., Gilray, J., Scholes, S., Howie, F., & Nettleton, P. F. (2008). Development of a real time reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples and its comparison with immunohistochemistry and immunofluorescence antibody testing. *Veterinary microbiology*, 126(1-3), 264-270.
3. Thonur, L., Maley, M., Gilray, J., Crook, T., Laming, E., Turnbull, D., ... & Willoughby, K. (2012). One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 1-9.
4. Ferguson, L., Eckard, L., Epperson, W. B., Long, L. P., Smith, D., Huston, C., ... & Wan, X. F. (2015). Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology*, 486, 28-34.
5. Han DG, Ryu JH, Park J, Choi KS. Identification of a new bovine viral diarrhea virus subtype in the Republic of Korea. *BMC Vet Res*. 2018 Aug 7;14(1):233.
6. Valarcher JF, Schelcher F, Bourhy H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10714-28
7. Lim EH, Lim SI, Kim MJ, Kwon M, Kim MJ, Lee KB, Choe S, An DJ, Hyun BH, Park JY, Bae YC, Jeoung HY, Lee KK, Lee YH. First Detection of Influenza D Virus Infection in Cattle and Pigs in the Republic of Korea. *Microorganisms*. 2023 Jul 5;11(7):1751.
8. Seong-Cheol Cho, Hyung-Seok Yang, Changnam Park, Si-Taek Kim, Eun-Ju Ko, Won-Geun Son. Prevalence of bovine viral diarrhea virus from Korean native cattle farms in Jeju. *Korean J Vet Res*. 2023;63(2):e12.
9. Chae J-B, Kim H-C, Kang J-G, Choi K-S, Chae J-S, Yu D-H, et al. The prevalence of causative agents of calf diarrhea in Korean native calves. *J Ani Sci Technol*. 2021;63:864-71.
10. Foster D, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2009;25:13-36. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.013.
11. Lee S, VanBik D, Kim H, Cho A, Kim J, Byun J, et al. Prevalence and molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in calves with diarrhoea. *Vet Rec*. 2016;178:633.
12. Singh BB, Sharma R, Kumar H, Banga H, Aulakh RS, Gill JPS, et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet Parasitol*. 2006;140:162-5.
13. Kim EM, Cho HC, Shin SU, Park J, Choi KS. Prevalence and genetic characterization of bovine coronavirus identified from diarrheic pre-weaned native Korean calves from 2019 to 2021. *Infect Genet Evol*. 2022;100:105263.
14. Solberg OD, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg JN. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology*. 2009;385:58-67.
15. Letellier C, Kerkhofs P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods*. 2003;114:21-7.
16. Guy RA, Payment P, Krull UJ, Horgen PA. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:5178-85.
17. Thantrige-Don N, Lung O, Furukawa-Stoffer T, Buchanan C, Joseph T, Godson DL, et al. A novel multiplex PCR-electronic microarray assay for rapid and simultaneous detection of bovine respiratory and enteric pathogens. *J Virol Methods*.

2018;261:51-62.

18. Chae J-B, Kim H-C, Kang J-G, Choi K-S, Chae J-S, Yu D-H, et al. The prevalence of causative agents of calf diarrhea in Korean native calves. *J Ani Sci Technol*. 2021;63:864-71.
19. Park GN, Choe S, Cha RM, Shin J, Kim KS, An BH, Kim SY, Hyun BH, An DJ. Genetic Diversity of Bovine Group A Rotavirus Strains Circulating in Korean Calves during 2014 and 2018. *Animals (Basel)*. 2022 Dec 15;12(24):3555.
20. Belák S, Karlsson OE, Blomström A-L, Berg M, Granberg F. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. *Vet microbiol*. 2013;165:95-101.
21. Kishimoto M, Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Naoi Y, Sano K, Okazaki-Terashima S, Oba M, Katayama Y, Sato R, Asai T, Mizutani T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. *J Vet Med Sci*. 2017 Mar 18;79(3):517-523.
22. Zhou Y, Chen X, Tang C, Yue H. Detection and Genomic Characterization of Bovine Rhinitis Virus in China. *Animals (Basel)*. 2023 Jan 16;13(2):312.
23. Bhattarai S, Lin CM, Temeeyasen G, Palinski R, Li F, Kaushik RS, Hause BM. Bovine rhinitis B virus is highly prevalent in acute bovine respiratory disease and causes upper respiratory tract infection in calves. *J Gen Virol*. 2022 Feb;103(2):001714.
24. Hoet AE, Saif LJ. Bovine torovirus (Breda virus) revisited. *Anim Health Res Rev*. 2004 Dec;5(2):157-71.
25. Park SJ, Oh EH, Park SI, Kim HH, Jeong YJ, Lim GK, Hyun BH, Cho KO. Molecular epidemiology of bovine toroviruses circulating in South Korea. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 25;126(4):364-71.
26. Saif LJ. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2010 Jul;26(2):349-64. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.005. PMID: 20619189; PMCID: PMC4094360.
27. Khramtsov NV, Woods KM, Nesterenko MV, Dykstra CC, Upton SJ. Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Mol Microbiol*. 1997;26(2):289-300.
28. Murakoshi F, Ichikawa-Seki M, Aita J, Yaita S, Kinami A, Fujimoto K, et al. Molecular epidemiological analyses of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of *Cryptosporidium parvum*, in Japan. *Virus Research*. 2016;211:69-72.
29. Berber E, Şimşek E, Çanaköğlü N, Sürsal N, Gençay Göksu A. Newly identified *Cryptosporidium parvum* virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transbound Emerg Dis*. 2021 Jul;68(4):2571-2580. doi: 10.1111/tbed.13929. Epub 2020 Dec 14.
30. Deng S, He W, Gong A-Y, Li M, Wang Y, Xia Z, et al. *Cryptosporidium* uses CSpV1 to activate host type I interferon and attenuate antiparasitic defenses. *Nature Communications*. 2023;14(1):1456
31. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res*. 2018 Sep 15;257:68-73.
32. Hause BM, Nelson E, Christopher-Hennings J. Identification of boosepivirus B in U.S. calves. *Arch Virol*. 2021 Nov;166(11):3193-3197.
33. Ji C, Zhang Y, Feng Y, Zhang X, Ma J, Pan Z, Kawaguchi A, Yao H., Systematic

- Surveillance of an Emerging Picornavirus among Cattle and Sheep in China. *Microbiol Spectr.* 2023 Jun 15;11(3):e0504022.
34. Lu G, Huang M, Chen X, Sun Y, Huang J, Hu R, et al. Identification and genome characterization of a novel feline picornavirus proposed in the Hunnivirus genus. *Infect Genet Evol.* 2019;71:47-50. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.011.
 35. Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, et al. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio.* 2014;5:e01933-14. doi: 10.1128/mBio.01933-14.
 36. Lu G, Huang M, Chen X, Sun Y, Huang J, Hu R, et al. Identification and genome characterization of a novel feline picornavirus proposed in the Hunnivirus genus. *Infect Genet Evol.* 2019;71:47-50. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.011.
 37. Reuter G, Pankovics P, Knowles NJ, Boros Á. Two closely related novel picornaviruses in cattle and sheep in Hungary from 2008 to 2009, proposed as members of a new genus in the family Picornaviridae. *J Virol.* 2012;86:13295-302. doi: 10.1128/JVI.01142-12.
 38. Zhu Q, Li B, Sun D. Bovine Astrovirus—A Comprehensive Review. *Viruses.* 2022;14:1217
 39. Lee SY, Kim JH, Kim YJ, Kim YS, Roh SG, Lee KH, et al. Astrovirus infection in cattle with nonsuppurative meningoencephalitis in South Korea. *Viruses.* 2021;13(10):1941
 40. Li Y, Chang J, Wang Q, Yu L. Isolation of two Chinese bovine enteroviruses and sequence analysis of their complete genomes. *Arch Virol.* 2012;157:2369-75. doi: 10.1007/s00705-012-1424-6.
 41. Wang L, Fredrickson R, Duncan M, Samuelson J, Hsiao SH. Bovine kobuvirus in calves with diarrhea, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:176-178. doi: 10.3201/eid2601.191227
 42. Park SJ, Kim HK, Song DS, Moon HJ, Park BK. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1178-82
 43. Park SI, Jeong C, Park SJ, Kim HH, Jeong YJ, Hyun BH, et al. Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea. *Vet Microbiol.* 2008;130:371-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.01.017.
 44. Di Felice E, Mauroy A, Dal Pozzo F, Thiry D, Ceci C, Di Martino B, et al. Bovine noroviruses: a missing component of calf diarrhoea diagnosis. *Vet J.* 2016;207:53-62
 45. Kawasaki J, Kojima S, Tomonaga K, Horie M. Hidden viral sequences in public sequencing data and warning for future emerging diseases. *mBio.* 2021;12:e01638-21.
 46. Oba M, Obinata S, Takemae H, Kazama K, Oguro M, Ito K, et al. Prevalence and genetic diversity in bovine parechovirus infecting Japanese cattle. *Arch Virol.* 2023;168:1-5. .
 47. Kishimoto M, Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Naoi Y, Sano K, Okazaki-Terashima S, Oba M, Katayama Y, Sato R, Asai T, Mizutani T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. *J Vet Med Sci.* 2017 Mar 18;79(3):517-523.
 48. Berber E, Şimşek E, Çanakoğlu N, Sürsal N, Gençay Göksu A. Newly identified *Cryptosporidium parvum* virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transbound Emerg Dis.* 2021 Jul;68(4):2571-2580.

49. Murakoshi F, Ichikawa-Seki M, Aita J, Yaita S, Kinami A, Fujimoto K, Nishikawa Y, Murakami S, Horimoto T, Kato K. Molecular epidemiological analyses of Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of Cryptosporidium parvum, in Japan. Virus Res. 2016 Jan 4;211:69-72.
50. Valeix N, Costa D, Basmaciyan L, Valot S, Vincent A, Razakandrainibe R, Robert-Gangneux F, Nourrisson C, Pereira B, Fréalle E, Poirier P, Favennec L, Dalle F. Multicenter Comparative Study of Six Cryptosporidium parvum DNA Extraction Protocols Including Mechanical Pretreatment from Stool Samples. Microorganisms. 2020 Sep 22;8(9):1450.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

소 호흡기 병원체 조사를 위한 인도 현지 네트워크 구축
 소 소화기 병원체 조사를 위한 추가 인도 네트워크 구축
 소 호흡기 병원체 진단용 multiplex real time PCR 진단법 수립
 한국 인도 소 호흡기 병원체 역학조사 및 유전자 분석
 한국 소 설사 병원체 역학조사
 NGS를 이용한 국내 소 호흡기 및 소 설사 관련 바이러스 검출
 국내 미보고 소 호흡기 바이러스 2종에 대한 현황 연구 수행 (BRAV 및 BRBV)
 국내 미보고 소 설사 바이러스 2종에 대한 현황 연구 수행 (CsPV1 및 BooV)

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

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1년차 (2022)	2단계 (2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	학술발표	목표(단계별)		2	2	4	20
		실적(누적)		2	2	4	
	논문발표	목표(단계별)		0	2	2	-
		실적(누적)		0	1	1	
특허출원	목표(단계별)		0	1	1	30	
	실적(누적)		0	2	2		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)		0	1	1	10
		실적(누적)		0	1	1	
	고용창출	목표(단계별)		3	3	6	40
		실적(누적)		3	2	5	
계			목표	5	9	14	100
			실적	5	9	14	

* 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, 신제품

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	소 유래 작은와포자충 바이러스 1 진단용 프라이머 세트, 조성물 진단 키트 및 진단 방법	한국	한국축산 데이터	23년9월 24일	10-2023-0127587					100	
2	소 유래 부세피바이러스 진단용 프라이머 세트, 진단 키트 및 진단 방법	한국	한국축산 데이터	23년 9월 27일	10-2023-0130691					100	

○ 지식재산권 활용 유형

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

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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 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	기술이전	Technology License Agreement	Animal Industry Data India Corporation	12.12.01	60,000 \$	60,000 \$

- * 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		국내	팜스플랜케 어						

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

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

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
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)	명칭	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							

□ 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)

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 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 생산·판매 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(%)
○ 소에서 Influenza D virus 역학조사 및 유전자 분석	○ 국내에서 수집된 총 1,657 샘플에서 influenza D virus가 검출되지 않았음. 다만, 인도에서 수집한 1,000개의 샘플 중 10개에서 (1%)에서 IDV를 검출하였음. . ○ 소 호흡기 바이러스 6종에 대하여 한국 및 인도 샘플을 이용하여 역학 조사 및 유전자 분석 실시하였음. 또한, NGS를 통해 새롭게 확인된 BRAV 및 BRBV에 대한 조사를 국내 샘플을 대상으로 수행하였음	○ 50
○ 소 호흡기 발병 바이러스 역학조사 및 유전자 분석		○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 최근 국내연구에 의하면, 2022년에 수집된 총 999개의 소 샘플 (nasal swab: 954개, 폐조직: 45개)를 real time RT-PCR 진단법을 이용하여 진단을 한 결과, 경기 및 경북 소재 농장에서 수집된 14개의 nasal swab 샘플에서 IDV가 검출되었음 (양성율 1.4%)
- 또한, 본 연구팀이 검사한 1000개의 인도 nasal swab 샘플에서 IDV는 1% 검출이 되었음.
- 최근 보고와 본 연구결과를 종합하여 볼 때, IDV는 국내에 존재하고 있으나, 양성율이 낮고 특정 지역에만 검출되었기 때문에, 검사 샘플 수와 해당 지역 검사 농장 수를 더 늘렸어야 된다고 판단됨.

2) 자체 보완활동

- 본 연구팀은 연구계획서에 기술되어 있는 계획보다, 더 많은 샘플을 확보하여 연구를 진행하였을 뿐만 아니라, 계획서 상에 기술되어 있지 않은 추가 연구를 진행하였음
- 계획서 상에는 총 10-12개 한국 및 인도농가에서 nasal swab 샘플 500개를 확보하는 것으로 되어 있었으나, 한국에서만 nasal swab 샘플 1,114개, 폐조직 151개, 전혈 392개를 확보하였고, 인도에서는 1,000개의 nasal swab 샘플을 확보하여 연구를 진행하였음.
- 계획서에서는 기술되지 않았던, NGS를 이용하여 IDV 검출을 시도하였음. 하지만, NGS를 이용해도 IDV를 발견하지 못했지만, 한국에서 보고되지 않았던 신규 소 호흡기 바이러스 2종 (BRAV, BRBV)을 발견하였고, BRAV 및 BRBV에 대한 국내 현황 및 유전자 분석을 수행 하였음.

3) 연구개발 과정의 성실성

-
- 인도 현지 네트워크를 구축하기 위하여, 인도법인과 긴밀하게 소통하여 현지 수의대 및 축산기업과 네트워크를 구축하였음.
 - 또한, 인도 DUVASU 수의대와 미팅을 통해서 소 소화기 질병 진단에 대한 수요를 확인하였고, LOI를 받는 등 추가 현지 네트워크를 구축하였음
 - 이에 추가 협력을 통한 인도 네트워크 고도화를 위하여, 계획서에는 기술되지 않은 송아지 설사 병원체에 대한 진단법을 연구, 국내 역학조사를 실시하였음.
 - 또한, NGS를 통한 송아지 설사에 관련 신규 바이러스 2종 (CSpV1 및 BooV) 및 neglected 바이러스들을 확인 하였고, CSpV1 및 BooV의 국내 현황 및 유전자 분석을 수행하였음.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 본 연구팀은 인도 현지 네트워크를 성공적으로 구축하여 그동안 연구가 많이 되지 않았던 인도 및 한국에서의 소 호흡기 병원체에 대한 역학조사 및 신규 바이러스 발견을 통하여 앞으로 소 호흡기 질병관리에 대한 방향성을 제시하였음. 또한, 소 소화기 병원체에 대한 역학조사 및 신규 바이러스를 발견하여, 소 소화기 병원체에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제시하였음.
 - 또한, 인도와의 지속적인 교류를 통해 추후 협력 가능성을 열어놓았음
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	0.4	
	비SCIE		
	계	0.4 (총 2건)	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계	0.2 (총 1건)	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서
2. 성과증빙자료	1) 특허 출원
	2) 기술이전
	3) 고용창출
	4) 논문(SCI)
	5) 학술발표

[별첨 1]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호			122061-2	
사업구분	000000사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술고도화지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사			과제유형	(개발)
연구개발기관	한국축산데이터 주식회사			연구책임자	강정원
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	22.04.01 ~ 22.12.31	257,142,000	64,300,000	321,442,000
	2차년도	23.01.01 ~ 23.12.31	342,858,000	114,300,000	457,158,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		600,000,000	178,600,000	778,600,000
참여기업					
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024.05.9

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국축산데이터	연구소장	강정원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	강정원
----	-----

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

- 본 연구팀은 인도 현지 네트워크를 성공적으로 구축하여 그동안 연구가 많이 되지 않았던 인도 및 한국에서의 소 호흡기 병원체에 대한 역학조사를 실시하여, 앞으로 소 호흡기 질병관리에 대한 방향성을 제시하였음.
- 본 연구에서는 한국 및 인도 소 호흡기 샘플 및 한국 분변 샘플을 확보하고, 기존에 알려진 소 호흡기 및 설사관련 병원체가 검출되지 않은 샘플들을 이용하여, 소 호흡기 관련 신규바이러스 2종 (BRAV, BRVB) 및 송아지 설사관련 신규바이러스 2종 (CSpV1, BooV)를 발견하였을 뿐만 아니라, 기존에 검사를 수행하지 않았던 neglected 바이러스들을 발견하여 NGS를 이용한 병원체 진단의 유용성을 제시하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수,

- 본 연구팀은 인도 현지 네트워크를 성공적으로 구축하여 그동안 연구가 많이 되지 않았던 인도 및 한국에서의 소 호흡기 병원체에 대한 역학조사를 실시하여, 앞으로 소 호흡기 질병관리에 대한 방향성을 제시하였음.
- 또한, 인도와의 지속적인 교류를 통해 추후 협력 가능성을 열어놓았음
- 기존에 알려진 소 호흡기 및 설사관련 병원체가 검출되지 않은 샘플들을 이용하여, 소 호흡기 관련 신규바이러스 2종 (BRAV, BRVB) 및 송아지 설사관련 신규바이러스 2종 (CSpV1, BooV)를 발견하였음. 이는 앞으로 축우 질병진단 및 관리에 있어 기존에 알려진 병원체 뿐만 아니라, 신규 확인된 병원체를 고려해야된다는 새로운 방향성을 제시하고 있음. 또한, 앞으로 신규 바이러스 4종에 대한 국내 분포, 유전적 특성 규명, 분리등 추가적인 연구를 통해 백신 개발등 효율적인 관리 대책이 필요하다는 것을 시사하고 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 본 연구에서 확보된 소 호흡기 병원체 진단법 및 한국축산데이터가 자체확보한 송아지 설사관련 병원체 진단법에대한 한국축산데이터 인도법인과 기술이전계약 체결하였음
- 또한 본 연구팀이 개발하여 특허출원한 CSpV1 및 BooV 진단법이 향후 소 소화기 질병 병원체 모니터링에 이용될 수 있을뿐만아니라, 진단키트화 할 수 있을 가능성이 있음
- 본 연구에서 이용한 NGS를 이용한 소 호흡기 및 소화기 병원체 검출법도 향후, 소 병원체 모니터링에 이용될 수 있음.
- 인도 현지 네트워크를 구축하였고, 이 네트워크를 이용하여 앞으로 동물 감염병에참관관련 협력이 가능함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 본 연구팀은 연구계획서에 기술되어 있는 계획보다, 더 많은 샘플을 확보하여 연구를 진행하였을 뿐만 아니라, 계획서 상에 기술되어 있지 않은 추가 연구를 진행하였음
- 계획서 상에는 한국 및 인도 nasal swab 샘플 500개를 확보하는 것으로 되어 있었으나, 한국에서만 nasal swab 샘플 1114개, 폐조직 151개, 전혈 392개를 확보하였고, 인도에서는 1000개의 nasal swab 샘플을 확보하여 연구를 진행하였음.
- 계획서에서는 기술되지 않은 송아지 설사 병원체 관련 연구 및 NGS를 통한 신규 바이러스 발견, 신규바이러스의 국내 분포 현황을 연구하였음.
- 인도 현지 네트워크를 구축하기 위하여, 인도법인과 긴밀하게 소통하여 현지 수의대 및 축산기업과 네트워크를 구축하였음. 또한, 인도 현지 농가 및 연구기관과의 미팅에서 소 소화기 질병 진단에 대한 수요를 확인하였음.
- 이에 추가 협력을 통한 인도 네트워크 고도화를 위하여, 계획서에는 기술되지 않은 송아지 설사 병원체에 대한 진단법을 연구, 국내 역학조사를 실시하였음.
- 또한, NGS를 통한 송아지 설사에 관련 신규 및 neglected 바이러스를 확인하였고, 신규바이러스의 국내 분포 현황 및 유전자 분석을 수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 보통, 미흡, 극히 불량)

계획서 상으로는 논문 2편 출판, 특허출원 1건, 학술대회 4건 발표로 되어 있으며, 본 연구를 통해서 논문 1편 출판, 특허출원 2건, 학술대회 4건 발표를 수행하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
신규 소 Influenza D virus 분리	30	50	분리는 하지 못했지만, 인도에서 IDV의 존재를 확인하였음
소 호흡기 질병 원인체 역학조사 수	20	100	기존 호흡기 병원체 6종에 NGS로 검출한 BRAV 및 BRBV에 대한 역학조사를 추가로 수행하였음
분석 개체수	20	100	계획서 상에는 한국 및 인도 nasal swab 샘플 500개를 확보하는 것으로 되어 있었으나, 한국에서만 nasal swab 샘플 1114개, 폐조직 151개, 전혈 392개를 확보하였고, 인도에서는 1000개의 nasal swab 샘플을 확보하여 연구를 진행하였음.
원인체 진단: 민감도/특이도	30	100	본 연구에서 수립한 multiplex real time PCR의 R2값은 0.978 - 0.997로 singleplex real-time PCR은 0.983 - 0.994로 확인되었음
합계	100점	88%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 인도와의 현지 네트워크 구축을 통하여 IDV를 비롯한 소 호흡기 병원체의 역학조사를 수행하여 “국내외 신변종 바이러스 협력체계 구축”이라는 당 사업의 목표를 충실히 수행하였음. 또한, 소 소화기 병원체에 대한 추가적인 연구 및 NGS를 이용한 신규 소 호흡기 및 소화기 병원체 및 여러 neglected 병원체들을 발견하여 축우 질병진단 및 관리에 있어 기존에 알려진 병원체 뿐만 아니라, 신규 확인된 병원체를 고려해야된다는 새로운 방향성을 제시하고 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

초기 목표였던 소 IDV의 분리는 국내 IDV 자체의 낮은 양성을 및 특정 지역에만 분포하는 특성으로 인하여 달성하지는 못하였음. 하지만, 이를 극복하기 위하여 당초계획대비 샘플 수를 2배 넘게 분석하였으며, NGS를 이용하여 검출을 수행하는 등 추가적인 노력을 했다는 점을 고려할 필요가 있음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구에서 확보된 소 호흡기 병원체 진단법 및 한국축산데이터가 자체 확보한 송아지 설사관련 병원체 진단법에 대한 한국축산데이터 인도법인과 기술이전계약 체결하였음
- 또한 본 연구팀이 개발하여 특허출원한 CSpV1 및 BooV 진단법이 향후 소 소화기 질병 병원체 모니터링에 이용될 수 있을뿐만아니라, 진단키트화 할 수 있을 가능성이 있음
- 본 연구에서 이용한 NGS를 이용한 소 호흡기 및 소화기 병원체 검출법도 향후, 소 병원체 모니터링에 이용될 수 있음.
- 본 연구 사업을 통하여 구축된 인도 네트워크를 이용하여 앞으로 동물 감염병 예찰관련 협력가능함

[별첨 1]

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	가축질병대응기술고도화
연구과제명	신종 소 인플루엔자 D바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사			
주관연구개발기관	한국축산데이터 주식회사		주관연구책임자	강정원
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	600,000,000	178,600,000		778,600,000
연구개발기간	2022.04.01. ~ 2023.12.31.			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①소에서 Influenza D virus 역학조사 및 유전자 분석	국내에서 수집된 총 1,657 샘플에서 소 influenza D virus가 검출되지 않았음. 다만, 인도에서 수집한 1,000개의 샘플 중 10개에서 (1%)에서 IDV를 검출하였음.
②소 호흡기 발병 바이러스 역학조사 및 유전자 분석	소 호흡기 바이러스 6종에 대하여 한국 및 인도 샘플을 이용하여 역학 조사 및 유전자 분석 실시하였음. 또한, NGS를 통해 새롭게 확인된 BRAV 및 BRBV에 대한 조사를 국내 샘플을 대상으로 수행하였음

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구활용예) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 인 제 이 기	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	10			10		10			30				20						

	출원	등록	등록	A R T	료	화	액	액	창출	유치		C I	S C I	평 가 수 준	발표		활용	전시	확 보 (이 수 비 율)	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	20	10			10		10		30						20					
최종목표	2	1			38	1	950	350	6			3			8					
연구기간내 달성실적	2								6			1			4					
연구종료후 성과장출 계획		1			38	1	950	350				2			4					

[별첨 2]

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	TECHNOLOGY LICENSE AGREEMENT		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(기술이전)		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	2023P0083
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	한국축산데이터 주식회사 농업회사법인
【특허고객번호】	1-2018-066211-2
【대리인】	
【성명】	개인정보 삭제
【대리인번호】	9-2003-000483-2
【포괄위임등록번호】	2018-079062-1
【발명의 국문명칭】	소 유래 작은와포자충 바이러스 1 진단용 프라이머 세트, 조성물, 진단 키트 및 진단 방법
【발명의 영문명칭】	PRIMER SETS, COMPOSITION, DIAGNOSTIC KIT AND DIAGNOSTIC METHOD FOR DIAGNOSING CATTLE-DERIVED CRYPTOSPORIDIUM PARVUM VIRUS 1
【발명자】	
【성명】	개인정보 삭제
【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제
【발명자】	

【성명】	개인정보 삭제
【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제

【발명자】

【성명】	개인정보 삭제
【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 4

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545026731

【과제번호】 122061022SB010

【부처명】 농림축산식품부

【과제관리(전문)기관명】 농림식품기술기획평가원

【연구사업명】 가속질병대응기술고도화지원

【연구과제명】	신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사
【기여율】	1/1
【과제수행기관명】	한국축산데이터 주식회사
【연구기간】	2023.01.01 ~ 2023.12.31
【취지】	위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

개인정보 삭제

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0	면	46,000	원
【가산출원료】	26	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	8	항	574,000	원
【합계】	620,000원			
【감면사유】	소기업(70%감면)[1]			
【감면후 수수료】	186,000 원			

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	2023P0084
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	한국축산데이터 주식회사 농업회사법인
【특허고객번호】	1-2018-066211-2
【대리인】	
【성명】	개인정보 삭제
【대리인번호】	9-2003-000483-2
【포괄위임등록번호】	2018-079062-1
【발명의 국문명칭】	소 유래 부세피바이러스 진단용 프라이머 세트, 진단 키트 및 진단 방법
【발명의 영문명칭】	PRIMER SETS, DIAGNOSTIC KIT AND DIAGNOSTIC METHOD FOR DIAGNOSING BOVINE-DERIVED BOOSEPIVIRUS
【발명자】	
【성명】	개인정보 삭제
【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제
【발명자】	
【성명】	개인정보 삭제

【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제
【발명자】	
【성명】	개인정보 삭제
【성명의 영문표기】	개인정보 삭제
【주민등록번호】	개인정보 삭제
【우편번호】	개인정보 삭제
【주소】	개인정보 삭제
【출원언어】	국어
【심사청구】	청구
【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	3
【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】	
【과제고유번호】	1545026731
【과제번호】	122061022S8010
【부처명】	농림축산식품부
【과제관리(전문)기관명】	농림식품기술기획평가원
【연구사업명】	가축질병대응기술고도화지원
【연구과제명】	신종 소 인플루엔자 D 바이러스를 포함한 소 호흡기 질병의 국내/인도 예찰 및 유전자 특성 조사

TECHNOLOGY LICENSE AGREEMENT

BETWEEN

ANIMAL INDUSTRY DATA KOREA CORPORATION

AND

Animal Industry Data India Private Limited

THIS TECHNOLOGY LICENSE AGREEMENT (the "Agreement") is entered into 1st of December, 2023 (the "Effective Date"), by and between Animal Industry Data Korea Corporation, a corporation duly organized and validly existing under the laws of the Republic of Korea with its office at 305, Teheran-ro, Gangnam-gu, Seoul, Republic of Korea 06152 ("Licensor"), and Animal Industry Data India Private Limited, a company duly organized and validly existing under the laws of the Republic of India with its principal office at B-36, Safal Vivan, Sec-2, Nr Gota Overbridge, Gota, Daskroi, Ahmedabad, Gujarat, India, 382481 ("Licensee"). (Licensor and Licensee, collectively, the "Parties", and individually, a "Party")

The Parties hereby agree as follows:








ARTICLE 1 – DEFINITION

When used herein, each of the following terms shall have the respective meanings set forth below:







1.1. "LICENSED TECHNOLOGY" means the technology licensed by Licensor to Licensee as specifically identified in the Exhibit A attached hereto.

Pandhi

페이지 1 / 8

<h2 style="margin: 0;">4대 사회보험 사업장 가입자 명부</h2>						
발급번호	20221227229836	발급일시	2022-12-27 11:06	사업장 관리번호	87288008730	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업자등록번호	개인정보 삭제					
사업장 명칭	한국축산데이터 주식회사 농 업회사법인	한국축산데이터 주식회사 농 업회사법인	한국축산데이터 주식회사 농 업회사법인	한국축산데이터 주식회사 농 업회사법인	한국축산데이터 주식회사 농 업회사법인	
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 1						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격 취득 일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1	개인정보 삭제	황 개인정	2022.09.05	2022.09.05	2022.09.05	2022.09.05
2	개인정보 삭제	강 보	2022.09.13	2022.09.13	2022.09.13	2022.09.13
3	개인정보 삭제	이 삭제	2022.09.14	2022.09.14	2022.09.14	2022.09.14
이하 여백						
<p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 [확인용]으로 신청·발급된 것임을 알려드립니다.</p> <p>- [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적을 위해서만 제공하는 것이므로 재직증명용, 경력증명용, 대출용 등 다른 용도로 사용시에는 발급 기관에 법적 책임이 없다는 점을 알려드립니다.</p> <p>- 타 기관 제출을 위한 용도로 발급을 원하시는 경우에는 각 공단 지사 창구로 신청하시기 바랍니다.</p> <p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계 받아 제공하는 것입니다. (문의전화: 국민연금 1355, 건강보험 1577-1000, 산재·고용보험 1588-0075)</p> <p>- 사업장 가입자 명부의 내용이 사실과 다를 경우에는 해당 공단으로 문의하시기 바랍니다.</p> <p>- 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급받으시기 바랍니다.</p> <p>▷ [산재보험]의 경우, '자격취득일'은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 별목업 등 '자진신고 사업장'은 근로자 고용정보 신고 대상이 아니므로 '자격취득일(고용일)'은 표기되지 않습니다.</p> <p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 [사업장 관리번호]를 기준으로 작성되었습니다. (일부인원에 대한 가입자명부)</p>						
위와 같이 국민연금 가입내역을 확인합니다. 국민연금 이 사		위와 같이 건강보험 가입내역을 확인합니다. 국민건강보 이 사		위와 같이 산재보험 가입내역을 확인합니다. 근로복지공단 대전서부지사장		위와 같이 고용보험 가입내역을 확인합니다. 근로복지공단 대전서부지사장
						
						

4대 사회보험 사업장 가입자 명부

발급번호	20231107556816	발급일시	2023-11-07 16:57	사업장 관리번호	87288008730	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업자등록번호	개인정보 삭제					
사업장 명칭	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준) 1 / 1						
연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격 취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1	개인정보 삭제	김 개인정보 삭제	2023.05.22	2023.05.22	2023.05.22	2023.05.22
			이하 여백			
<p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 [확인용]으로 신청·발급된 것임을 알려드립니다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적을 위해서만 제공하는 것이므로 재직증명용, 경력증명용, 대출용 등 다른 용도로 사용시에는 발급 기관에 법적 책임이 없다는 점을 알려드립니다. - 타 기관 제출을 위한 용도로 발급을 원하시는 경우에는 각 공단 지사 창구로 신청하시기 바랍니다. <p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계 받아 제공하는 것입니다. (문의전화: 국민연금 1355, 건강보험 1577-1000, 산재·고용보험 1588-0075)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사업장 가입자 명부의 내용이 사실과 다를 경우에는 해당 공단으로 문의하시기 바랍니다. - 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급받으시기 바랍니다. <p>▷ [산재보험]의 경우, '자격취득일'은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 벌목업 등 '자진신고 사업장'은 근로자 고용정보 신고 대상이 아니므로 '자격취득일(고용일)'은 표기되지 않습니다.</p> <p>▷ 위 사업장 가입자 명부는 [사업장 관리번호]를 기준으로 작성되었습니다. (일부인원에 대한 가입자명부)</p>						
위와 같이 국민연금 가입내역을 확인합니다.  국민연금공단 이사장		위와 같이 건강보험 가입내역을 확인합니다.  국민건강보험공단 이사장		위와 같이 산재보험 가입내역을 확인합니다.  근로복지공단 대전서부지사장		
						

4대 사회보험 사업장 가입자 명부

발급번호	20231122804931	발급일시	2023-11-22 16:39	사업장 관리번호	87288008730
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업자등록번호	개인정보 삭제				
사업장 명칭	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사	한국축산데이터 주식회사	

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)

1 / 1

연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격 취득일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1	개인정보 삭제	조 개인정보 삭제	2023.09.13	2023.09.13	2023.09.13	2023.09.13
이하 여백						

- ▷ 위 사업장 가입자 명부는 [확인용]으로 신청·발급된 것임을 알려드립니다.
- [확인용]은 4대 사회보험의 업무목적만을 위해서만 제공하는 것이므로 재직증명용, 경력증명용, 대출용 등 다른 용도로 사용시에는 발급 기관에 법적 책임이 없다는 점을 알려드립니다.
 - 타 기관 제출을 위한 용도로 발급을 원하시는 경우에는 각 공단 지사 창구로 신청하시기 바랍니다.
- ▷ 위 사업장 가입자 명부는 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계 받아 제공하는 것입니다.(문의전화: 국민연금 1355, 건강보험 1577-1000, 산재·고용보험 1588-0075)
- 사업장 가입자 명부의 내용이 사실과 다를 경우에는 해당 공단으로 문의하시기 바랍니다.
 - 과거 가입내역은 해당 보험별 각 공단에 문의하여 발급받으시기 바랍니다.
- ▷ [산재보험]의 경우, '자격취득일'은 근로자 고용일을 뜻하며, 건설업 및 별목업 등 '자진신고 사업장'은 근로자 고용정보 신고 대상이 아니므로 '자격취득일(고용일)'은 표기되지 않습니다.
- ▷ 위 사업장 가입자 명부는 [사업장 관리번호]를 기준으로 작성되었습니다.(일부인원에 대한 가입자명부)

위와 같이 국민연금
가입내역을 확인합니다.

국민연금
이 사 장

위와 같이 건강보험
가입내역을 확인합니다.

국민건강보
이 사 장

위와 같이 산재보험
가입내역을 확인합니다.

근로복지공단
대전서부지사장

위와 같이 고용보험
가입내역을 확인합니다.

근로복지공단
대전서부지사장

청림
국민연금

청림
세상

多
가치 CLEAN
세상 근로복지공단

Brief Report

The First Identification of *Cryptosporidium parvum* Virus-1 (CSpV1) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) Calves in Korea

개인정보 삭제

개인정보 삭제



Citation: Chae, J.-B.; Shitt, S.-U.; Kim, S.; Jo, Y.-M.; Roh, H.; Chae, H.; Kim, W.-G.; Chae, J.-S.; Song, H.; Kang, J.-W. The First Identification of *Cryptosporidium parvum* Virus-1 (CSpV1) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) Calves in Korea. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 633. <https://doi.org/10.3390/vetsci10110633>

Academic Editor: Vittorio Sardese

Received: 6 September 2023

Revised: 20 October 2023

Accepted: 23 October 2023

Published: 26 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: *Cryptosporidium* is a parasite that causes digestive diseases in cows, and a virus called *Cryptosporidium parvum* virus-1 (CSpV1) is associated with it. We investigated the presence and features of CSpV1 in diarrhea samples of Hanwoo calves (Korean indigenous cattle). Out of 140 samples, 70 were positive for *Cryptosporidium* and 70 were negative. CSpV1 was found in 20% of the samples, more commonly in those already positive for the parasite. This is the first study on CSpV1 in Korea, offering insights into the relationship between the parasite and virus in cows.

Abstract: *Cryptosporidium* is an obligate coccidian parasite that causes enteric diseases in bovine species. A double-stranded RNA virus associated with *C. parvum* oocysts, *Cryptosporidium parvum* virus-1 (CSpV1), has been characterized. However, the relationship between the abovementioned coccidian parasite and the virus has not been studied in the context of the known clinical outcomes. This study aimed to characterize the prevalence and molecular traits of CSpV1 in diarrheal feces of Hanwoo (Korean indigenous cattle) calves. Of the 140 fecal samples previously tested for *C. parvum*, which were obtained from Hanwoo calves aged 60 days, 70 tested positive and 70 tested negative. These samples were included in this study. By using the polymerase chain reaction (PCR) analysis targeting the *RdRp* gene of CSpV1, we detected CSpV1 in 28 samples (20.0%), with infection rates of 31.4% (22/70) in *C. parvum*-positive and 8.6% (6/70) in *C. parvum*-negative samples. CSpV1 samples detected in the same farm were clustered together. To the best of our knowledge, this is the first study to report the prevalence and molecular characteristics of CSpV1 in Hanwoo calves in the Republic of Korea, providing important insights into the relationship between *C. parvum* and CSpV1 in bovine hosts.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; *Cryptosporidium parvum* virus-1; Hanwoo; prevalence; phylogenetic analysis

1. Introduction

Cryptosporidium spp. are intracellular coccidian parasites with a well-established enteric nature, primarily infecting a plethora of host species, most notably bovine species [1]. There were numerous species of *Cryptosporidium* spp. identified within cattle populations: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, and *C. suis* [2]. Among them, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, and *C. andersoni* have been revealed to be the primary causative agents for most bovine infections [3].

Author Contributions: Conceptualization, J.-B.C., J.-S.C. and H.S.; data curation, J.-B.C., S.-U.S., Y.-M.J., H.R. and H.C.; formal analysis, J.-B.C., S.-U.S. and J.-S.C.; methodology, J.-B.C., S.-U.S., S.K., H.R. and W.-G.K.; validation, J.-B.C., H.C. and J.-W.K.; investigation, J.-B.C., S.-U.S., Y.-M.J., S.K. and W.-G.K.; writing—original draft, J.-B.C., S.-U.S. and H.S.; writing—review and editing, J.-W.K. and J.-S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Animal Disease Management Technology Advancement Support Program (Project No. 122061-2).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study because this article does not contain any studies with live animals performed by any of the authors. All samples used in this article were received from farmers or field veterinarians who submitted the samples for diagnosis.

Informed Consent Statement: An informed consent statement was provided by all animals' owners.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitology* **2014**, *141*, 1667–1685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dărăbuș, G.; Lupu, M.A.; Mederle, N.; Dărăbuș, R.G.; Imre, K.; Mederle, O.; Imre, M.; Paduraru, A.A.; Morariu, S.; Olariu, T.R. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in Romania: A Review. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lichtmannsperger, K.; Harl, J.; Freudenthaler, K.; Hinney, B.; Wittek, T.; Joachim, A. *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium ryannae*, and *Cryptosporidium botis* in samples from calves in Austria. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 4291–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Santin, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2020**, *36*, 223–238. [[CrossRef](#)]
- Ryan, U.; Zahedi, A.; Papparini, A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 535–547. [[CrossRef](#)]
- Sparks, H.; Nair, G.; Castellanos-Gonzalez, A.; White, A.C. Treatment of *Cryptosporidium*: What we know, gaps, and the way forward. *Curr. Trop. Med. Rep.* **2015**, *2*, 181–187. [[CrossRef](#)]
- Shehata, A.A.; Bando, H.; Fukuda, Y.; Kabir, M.H.B.; Murakoshi, F.; Itoh, M.; Fujikura, A.; Okawa, H.; Takuto, E.; Akira, G.; et al. Development of a highly sensitive method for the detection of *Cryptosporidium parvum* virus type 1 (CSpV1). *Jpn. J. Vet. Res.* **2020**, *68*, 159–170.
- Gallimore, C.I.; Green, J.; Casemore, D.P.; Brown, D.W. Detection of a Picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Arch. Virol.* **1995**, *140*, 1275–1278. [[CrossRef](#)]
- Deng, S.; He, W.; Gong, A.Y.; Li, M.; Wang, Y.; Xia, Z.; Zhang, X.T.; Huang Pacheco, A.S.; Naqib, A.; Jenkins, M.; et al. *Cryptosporidium* uses CSpV1 to activate host type I interferon and attenuate antiparasitic defenses. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1456. [[CrossRef](#)]
- Vainio, E.J.; Chiba, S.; Ghabrial, S.A.; Maiss, E.; Roossinck, M.; Sabanadzovic, S.; Suzuki, N.; Xie, J.; Nibert, M.; Ictv Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Partitiviridae. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 17–18. [[CrossRef](#)]
- Cho, Y.L.; Han, J.I.; Wang, C.; Cooper, V.; Schwartz, K.; Engelken, T.; Yoon, K.J. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhoea. *Vet. Microbiol.* **2013**, *166*, 375–385. [[CrossRef](#)]
- Berber, E.; Şimşek, E.; Çanakoğlu, N.; Sürsal, N.; Gençay Göksu, A. Newly identified *Cryptosporidium parvum* virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 2571–2580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Murakoshi, F.; Ichikawa-Şeki, M.; Aita, J.; Yaita, S.; Kinami, A.; Fujimoto, K.; Nishikawa, Y.; Murakami, S.; Horimoto, T.; Kato, K. Molecular epidemiological analyses of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of *Cryptosporidium parvum*, in Japan. *Virus Res.* **2016**, *211*, 69–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Claudel, L.; Valeix, N.; Basmacıyan, L.; Pereira, B.; Costa, D.; Vincent, A.; Valot, S.; Favennec, L.; Dalle, F. Comparative study of eleven mechanical pretreatment protocols for *Cryptosporidium parvum* DNA extraction from stool samples. *Microorganisms* **2021**, *9*, 297. [[CrossRef](#)]
- Valeix, N.; Costa, D.; Basmacıyan, L.; Valot, S.; Vincent, A.; Razakandrainibe, R.; Robert-Gangneux, E.; Nourrisson, C.; Pereira, B.; Fréalle, E.; et al. Multicenter comparative study of six *Cryptosporidium parvum* DNA extraction protocols including mechanical pretreatment from stool samples. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Leoni, E.; Gallimore, C.I.; Green, J.; McLauchlin, J. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals by using a heteroduplex mobility assay and nucleic acid sequencing based on a small double-stranded RNA element. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 981–992. [[CrossRef](#)]

P-057

Prevalence of Various Pathogens Causing Calf Diarrhea in Korea

개인정보 삭제

Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Korea

Calf diarrhea is one of the most prevalent diseases in cattle industries. It has affected the morbidity and mortality of neonatal calves and their growth performances and has caused worldwide economic loss. There have been reported the impacts of pathogens causing diarrhea in calves. In this study, 7 pathogens (Bovine rotavirus group A (BRV), Bovine coronavirus (BCV), Bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV 1), Bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV 2), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Eimeria* spp.) causing calf diarrhea were investigated in the feces of calves in 7 farms using reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR. As a result, feces from 286 calves up to 60 days of age were collected during April to August 2022. Among 7 pathogens, *Cryptosporidium* spp. (28/286, 9.8%) were the most prevalent pathogens, followed by BRV (21/286, 7.3%), BVDV 2 (15/286, 5.2%), *Eimeria* spp. (7/286, 2.4%), *Giardia* spp. (4/286, 1.4%), BCV (4/286, 1.4%), and BVDV 1 (3/286, 1.0%). The information of these prevalence of pathogens would contribute to developing strategies for prevention and treatment of calf diarrhea in Korea.

Development of One Step Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for 3 Pathogens Causing Cattle Respiratory Diseases Complex in Nasal Swabs in Korea

개인정보 삭제

Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Korea

Bovine respiratory disease complex (BRDC) is the major cause of serious respiratory tract infections in calves. The disease is multifactorial, with either stress or reduced immunity allowing several pathogens to emerge. Since there have been various pathogens causing BRDC in calves, fast and accurate methods for detecting pathogens were necessary for the prevention of BRDC. In this study, we have developed a one-step multiplex real-time Polymerase Chain Reaction capable of detecting three viral pathogens (bovine viral diarrhea virus type 1, BVDV1; bovine viral diarrhea virus type 2, BVDV2; bovine respiratory syncytial virus, BRSV), simultaneously. To clarify the detection limits of developed assay, *in-vitro* transcribed RNA containing each pathogens RNA were generated and used as a template. And then, a total of 237 nasal swabs from calves up to 1 years old were collected from 7 farms in Korea during 4 months and all collected samples were investigated for these three pathogens. As a result, positive nasal swabs for BVDV1 and 8 positive nasal swabs for BVDV2 were detected in total. There was no BRSV in our samples. Further research would be needed to detect BRSV in calves and also other pathogens related to BRDC.



The first identification of a new bovine picornavirus (*Boosepivirus*) in *Hanwoo* (*Bos taurus coreanae*) calves in the Republic of Korea

개인정보 삭제

¹Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Republic of Korea, ²Laboratory of Veterinary Internal Medicine, BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Centre, Research Institute for Veterinary Science and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea, ³Department of stem cells and regenerative technology, KII, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea

Despite advancements in herd management, feeding, and pharmaceutical interventions, neonatal calf diarrhea (NCD) remains a major global health concern. Infectious pathogens, particularly bacteria, viruses, and parasites, are major contributors to NCD. Although several pathogens have been identified in the Republic of Korea (ROK), many NCD cases do not have a recognized etiological agent. This study explored the prevalence of some pathogens causing NCD in the ROK with a special interest in bovine boosepivirus (BooV), a picornavirus recently reported to be associated with calf diarrhea. In this retrospective study, 70 fecal samples from Hanwoo (*Bos taurus coreanae*, Korean indigenous cattle) calves were analyzed using RT-PCR and RT-qPCR for pathogen detection, followed by sequencing of the BooV isolates. The results revealed BooV was the most frequently detected pathogen with a prevalence of 35.7%. Co-infection analyses indicated that most BooV-positive samples (80%) were solely infected with BooV, indicating its significance in NCD in the ROK. Phylogenetic analysis classified all isolates in this study as BooV B. To the best of our knowledge, this is the first study to determine the prevalence and molecular characteristics of BooV in calf diarrhea in the ROK, highlighting the potential importance of BooV as a causative agent of calf diarrhea in the ROK and underscoring the need for further research on its epidemiology and pathogenicity.

Prevalence and molecular characteristics of *Bovine Respiratory Syncytial Viruses (BRSV)* in Korea

개인정보 삭제

¹Bio Team, Animal Industry Data Korea, Seoul, 06152, Republic of Korea, ²Laboratory of Veterinary Internal Medicine, BK21 FOUR Future Veterinary Medicine Leading Education and Research Centre, Research Institute for Veterinary Science and College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Republic of Korea

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is an important pathogen of the bovine respiratory disease complex (BRDC). However, its prevalence and molecular characteristics in Korea is have remained largely unexplored. In this study, 1,122 nasal swabs from 34 farms in 7 provinces were collected, and 0.4% (5/1,122) of samples were determined as BRSV-positive by RT-qPCR. Furthermore, molecular characterization for one BRSV isolate was conducted, focusing on the nucleotide sequences of glycoprotein (G), fusion (F) and nucleocapsid (N) gene. As results, G and F gene of the isolate was not clustered to any subgroup. On the other hand, N gene of the isolate was found to cluster with BRSVs from China, USA and Germany. In conclusion, these findings contribute to our understanding of the prevalence and molecular characteristics of BRSV in Korea, and indicate that further studies to comprehensively characterize BRSV in Korea are necessary.

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.