

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

가축질병대응기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003173-01

**인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향
분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자
수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발**

최종보고서

2020.07.17.

**주관연구기관 / 가톨릭대학교 산학협력단
협동연구기관 / 충북동물위생시험소 중부지소**

농 립 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향 분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자 정보 수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발”(개발기간:2018. 04. 26 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : 가톨릭대학교 산학협력단 (대표자) 전 신 수 (인)

협동연구기관명 : 충북 동물위생시험소 중부지소 (대표자) 송 영 각 (인)

주관연구책임자 : 정 승 현

협동연구책임자 : 강 신 석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	318046-2	해 당 단 계 연구 기 간	2018.04.26. - 2019.12.31	단 계 구 분	2차년도/2년
연구 사업 명	단 위 사 업	농림식품연구개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자 정보 수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발			
	세부 과제명	AIV의 NGS 데이터 생산 및 유전자데이터베이스 구축			
연구 책임자	정 승 현	해당단계 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 6 명 외부: 7 명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14 명 내부: 7 명 외부: 7 명	총 연구개발비	정부: 350,000천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	본 과제는 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」제24조의4에 따른 분류에서 보안과제에 해당 사항이 없으므로 일반과제에 해당함.				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호								MN8 09350 외 107건			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수
120

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>인수공통전염병인 조류인플루엔자 바이러스(AIV)의 국내발생 및 토착화에 대비하기 위하여 전장유전체 분석(NGS)를 통해 바이러스 유전자 진화양상 및 국내 전파 경로를 파악하고 AIV 백신접종이 인체감염에 미치는 영향을 분석하여 이를 통해 도출되는 빅데이터를 활용한 상시 모니터링 체계를 확립하고자 함</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 다지역 (국내 7개 시/군)에서 야외조류 검체 수집 (275건) - 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립 (관련 SOP 2건 및 소프트웨어 1건 개발, 유전자원 108건 기탁) - 국내 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 제시 (고병원성 AIV의 토착화 가능성) - 국내 조류인플루엔자 바이러스 아형별 분자적 특성 및 고병원성 유무, 재편성, 계통도 분석 - 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 제시 (관련 정책건의 1건) - 전파경로 분석을 통해 야생취가 조류인플루엔자 바이러스 전파 매개체임을 제시 - 조류인플루엔자 백신접종 모델 확립 및 백신접종 효능 규명 (관련 정책건의 1건) - 백신접종에 따른 인체영향 분석 - 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보에 대한 데이터베이스 구축 (1건) - 조류인플루엔자 바이러스의 클로닝벡터 구축 (4종) - 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 (LAMP 검사법 12종, RPA 검사법 1종 개발) - LAMP 검사법의 검출 민감도 및 특이도 평가 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 조류인플루엔자의 예방, 조기진단, 확산방지, 모니터링에 활용 - NGS기반 정밀검사를 통해 규명한 조류인플루엔자의 유래를 바탕으로 백신 개발에 활용 - 구축한 유전자 데이터베이스를 통해 가금류의 고병원성 조류인플루엔자 발생 대응 및 관리대책 수립의 과학적 근거 제공 - 유전자 빅데이터 분석 기반 조류인플루엔자 바이러스 발생 상시 감시 체계 시스템 제공 - 연구 개발에 적용한 다양한 분석알고리즘 및 소프트웨어를 다른 많은 질병연구 분야에서 활용 - LAMP 및 RPA 검사법을 검체수집 현장에서 바로 적용할 수 있는 휴대용 등온증폭기기 개발에 활용 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>조류인플루엔자</p>	<p>차세대염기서열분석</p>	<p>바이러스 변이</p>	<p>유전자 진화</p>	<p>조류인플루엔자 아형분석</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Avian Influenza</p>	<p>Next generation sequencing</p>	<p>virus variation</p>	<p>genetic evolution</p>	<p>AIV subtyping</p>

<본문목차>

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요	5
제 1 절 연구개발 목적	5
제 2 절 연구개발의 필요성	6
제 3 절 연구개발 범위	16
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	20
제 1 절 조류인플루엔자 바이러스 야외검체 확보	20
제 2 절 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 생산조건 확립	22
제 3 절 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 분석조건 확립	37
제 4 절 조류인플루엔자 바이러스 분석 소프트웨어 개발	41
제 5 절 조류인플루엔자 바이러스 유전자 진화 특성 분석	51
제 6 절 조류인플루엔자 바이러스 전파특성 및 전파경로	74
제 7 절 백신접종이 인체감염에 미치는 영향 분석	77
제 8 절 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보 데이터베이스 구축	80
제 9 절 조류인플루엔자 바이러스 검출기술 개발	83
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	102
제 1 절 목표	102
제 2 절 목표 달성여부	103
제 3 절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책	105
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	107
붙임. 참고 문헌	108

<별첨1> 연구개발보고서 초록

<별첨2> 자체평가의견서

<별첨3> 연구성과 활용계획서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

- 조류인플루엔자(Avian Influenza Virus, AIV)는 8개의 RNA 분절로 구성되며 16개 헤마글루티닌(HA)과 9개 뉴라미니다이스(NA)의 조합에 의해 144종의 아형이 존재 가능함
- 고병원성 AIV는 주로 H5와 H7 아형임. 국내에서 2003년 이후 15년간 총 6회의 고병원성 AIV가 발생하였으며 발생 및 피해규모가 증가 추세에 있음
- 국외 인체감염 사례가 지속적으로 보고되고 있다는 점에서 국내 대비가 반드시 필요함
- 현재 AIV의 신속진단 방법인 래피드 키트는 민감도가 낮으며, 실험실적 방법의 gold standard인 PCR 방법은 민감하지만 현장성이 떨어진다는 한계가 존재함
- 또한 현재의 PCR 방법은 새로운 아형의 검출이 불가능하고, 바이러스의 높은 변이율에 의한 위음성 가능성 및 유전자 재편성 양상을 확인할 수 없다는 문제가 있음
- 따라서 AIV의 아형 결정, 고병원성 판단, 바이러스 유래 규명 및 공중보건 위험 평가가 동시에 이루어 질 수 있는 정밀검사법과 현장에서 쉽게 사용할 수 있고 민감도가 높은 현장진단법의 개발이 절실함
- 특히, AIV 발생 대응을 위해서는 AIV의 전장유전체 자원을 확보하여 지역적, 시기적 전파경로를 확인하고 유전자 재편성 양상 및 변이 발생 파악이 중요함
- 최근 전장유전체분석법(NGS) 기술의 진전으로 유전체 데이터 생산에 소요되는 비용 및 시간이 많이 감소하였으나 AIV에 대한 전장유전체연구는 미비한 상황이기에 이에 대한 연구가 필요함
- 위를 바탕으로 본 연구개발의 최종 목표는 다음과 같음;

조류인플루엔자를 대상으로 NGS기반 정밀검사법을 적용하여 아형 결정, 고병원성 판단, 바이러스 유래 규명, 전파 특성, 유전자 재편성 양상 및 인체감염 위험을 동시에 평가하고, 이를 기반으로 유전자 정보 데이터베이스를 구축함

- 구체적으로 다음의 사항들을 중점적으로 수행하고자 함;
 - 현장 임상 검체의 NGS 분석을 위한 시퀀싱 라이브러리 구축 조건 최적화
 - NGS 데이터 기반 아형결정, 고병원성 판단, 바이러스 유래, 유전자 재편성, 계통도 규명을 위한 분석 파이프라인 구축
 - 조류인플루엔자 NGS 분석 방법의 표준운영절차(SOP) 개발
 - 현장 임상 검체를 대상으로 유전체 데이터를 생산하고, 구축된 분석 파이프라인을 통해 조류인플루엔자 백신 접종의 인체감염 영향, 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자

진화 특성, 전파 특성, 전파 경로를 분석함

- 생산된 국내 조류인플루엔자 유전자 정보 데이터베이스 구축

- 본 연구개발의 개요는 아래 그림 1과 같음



조류인플루엔자 정밀검사법 개발

그림 1. 연구 개발의 개요

제 2 절 연구개발의 필요성

가. 조류인플루엔자 바이러스 연구의 중요성

(1) 원인체

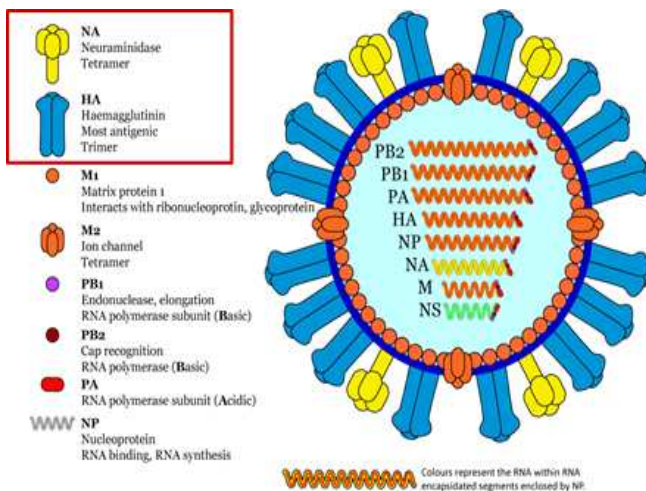


그림 2. 인플루엔자 바이러스의 구조

2). 이 중, 표면당단백질 헤마글루티닌 (hemagglutinin [HA])과 뉴라미니데이즈 (neuraminidase [NA])의 조합에 의해 다양한 아형으로 구분되며, 16 HA 및 9 NA 아형의 조합에 따라 144종의 아형이 존재 가능함

- 인플루엔자 바이러스는 orthomyxoviridae 과에 속하며 nucleoprotein(NP)과 matrix(M1) 단백질 항원형에 따라 A, B, C형으로 분류됨

- 인플루엔자 A 바이러스는 조류, 사람, 포유동물 등에 감염을 일으킬 수 있으며, B, C는 사람이 감염 숙주로 알려져 있음. 따라서 모든 AIV는 A형임

- 인플루엔자 A 바이러스는 서로 다른 8개의 RNA 분절(segment)로 구성됨 (그림

- 숙주의 종류에 따라서 감염될 수 있는 조류인플루엔자 바이러스의 아형에는 상당한 차이가 있음 (그림 3). 조류에는 144종의 아형 모두가 감염될 수 있지만 조류의 종속에 따라 감수성과 질병 발현여부는 각기 다름. 돼지에서는 H1 및 H3형이 주로 감염되며, 사람에게 감염되는 H 아형은 H1, H2, H3에 국한되었지만 근래에 들어 H5, H7 및 H9형으로 확대되고 있는 추세에 있음.

Hemagglutinin					Neuraminidase				
SubType	People	Poultry	Pigs	Bats / Other	SubType	People	Poultry	Pigs	Bats / Other
H1					N1				
H2					N2				
H3				Other Animals	N3				
H4				Other Animals	N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7				Other Animals	N7				Other Animals
H8					N8				Other Animals
H9					N9				
H10					N10				
H11					N11				
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									
H17									
H18									

그림 3. HA 및 NA 아형에 따른 다양한 숙주
(질병통제예방센터, 미국)

- 특히, 동일한 아형의 바이러스라 할지라도 바이러스의 유전자 배열에 따라 병원성 등의 특성은 전혀 다를 수 있음
- 예를 들어, 1994년 멕시코에서 H5N2, 1999년 이탈리아에서 H7N1, 2004년 캐나다에서 H7N2는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스로 확인되었으며, 이는 닭이나 칠면조에서 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 감염으로 시작되어 이것이 확산되고 지속적으로 순환감염 되면서 바이러스 유전자가 변이되어 고병원성을 나타낸 사례임
- 조류에서 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(highly pathogenic avian influenza, HPAI)는 주로 H5와 H7 아형을 가지며, 이들 중 일부가 고병원성으로 발현됨
- 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5, H7형)는 높은 폐사율과 심각한 산란율 저하를 유발하여 제1종 가축전염병으로 분류되며, 이외의 아형들은 저병원성으로 제2종 가축전염병으로 분류됨

- 특히, 조류에서 H7형은 H5형에 비해 병원성이 낮기 때문에 지속적인 조류와의 접촉으로 인한 인체 감염을 증가시킬 수 있음
- 예를 들어, H7N9은 2013년 저병원성 조류인플루엔자 바이러스로 보고되었으나, 2017년 인체감염자의 경우 고병원성 조류인플루엔자 바이러스로 규명되었음 (J Virol 2017, 98:18-30)
- 유전자 분석 결과 고병원성 H7N9 바이러스는 오리의 HA 유전자, 야생조류의 NA 유전자 및 닭에서 나머지 6개 유전자가 재편성된 바이러스로 규명되었음 (그림 4)

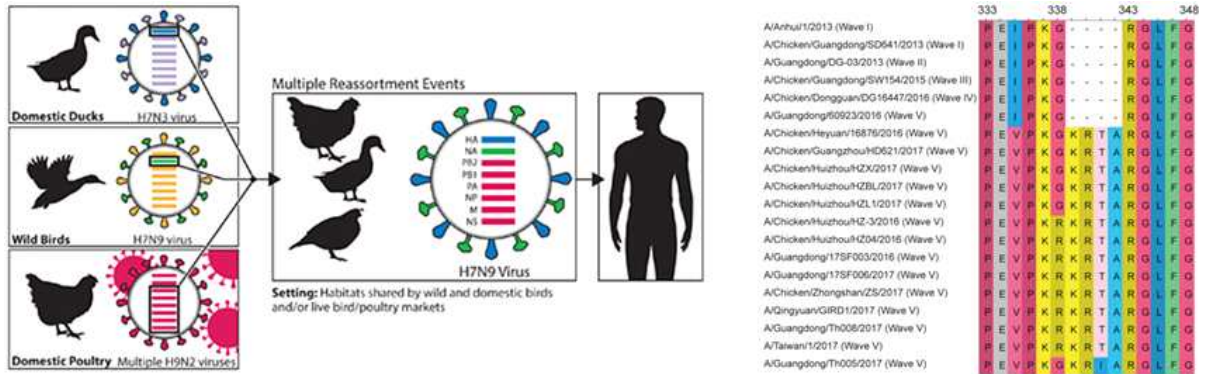


그림 4 . 유전자 재편성을 통한 고병원성 H7N9 조류인플루엔자 바이러스

(2) 국내 조류인플루엔자 현황

- 국내에서 2003년 이후 15년간 총 6회의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스가 발생하였으며, 발생 및 피해규모가 증가 추세에 있음 (그림 5)

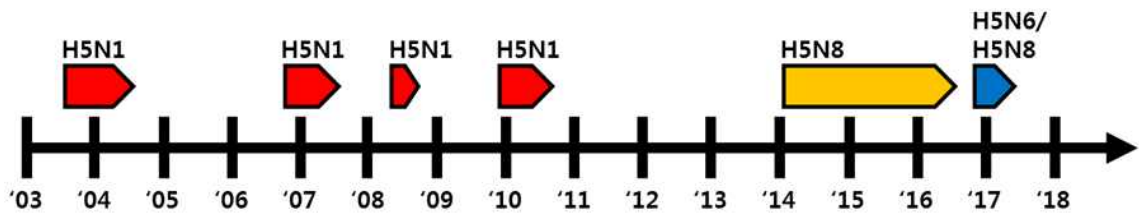


그림 5. 국내 고병원성 조류인플루엔자 발생현황

- H5N1은 2003년 국내에서 처음 보고된 이후 총 4번의 유행성 인플루엔자가 발생하였음. 특히, H5N1은 조류에서 고병원성을 보이며 높은 치사율의 원인이 되었음. 4번의 H5N1 발생으로 약 2,480만수가 살처분 되었으며 추정 손실액은 약 3,840억임
- H5N8은 2014년 한국에서 처음 발생하여 철새들에 의해 전세계로 퍼졌으며 고병원성임. 약 1,900만수가 살처분 되었으며 추정 손실액은 약 2,380억임
- H5N6는 2013년 중국에서 가장 먼저 발견되었으며, 국내에서는 2016~2017년까지 양계장에서 발견 사례가 보고되었음. 같은 시기에 발생한 H5N8과 합쳐 3,400만수 이상이

- 살처분 되었으며 추정 손실액도 3,000억이 넘음
- H7N9은 2016년 국내 야생 철새 분변에서 확인되었으나 현재까지 가금 농가에서 발생한 적은 없음
- 조류인플루엔자 바이러스의 발병은 가금류 농가에 경제적으로 큰 손실을 가져오며, 2011년부터 2017년까지 살처분된 가금류는 모두 7,146만 마리임
- 최근 국내 조류인플루엔자 바이러스발생 시기는 2017년 11월 H5N6가 보고되어 2018년 2월까지 지속되고 있음

(3) 국내·외 조류인플루엔자 인체 감염

- 4번의 대유행 바이러스가 1918년부터 2009년 사이 발생하였음
- 1918년 스페인 독감(H1N1) 이후 1957년 아시아 독감(H2N2), 1968년 홍콩 독감(H3N2)를 거쳐 2009년에는 돼지 독감(H1N1)이 발생하였으며, 5번째 대유행을 일으킬 가능성이 가장 높은 조류인플루엔자 바이러스의 발생이 지속적으로 보고되고 있음 (그림 6)

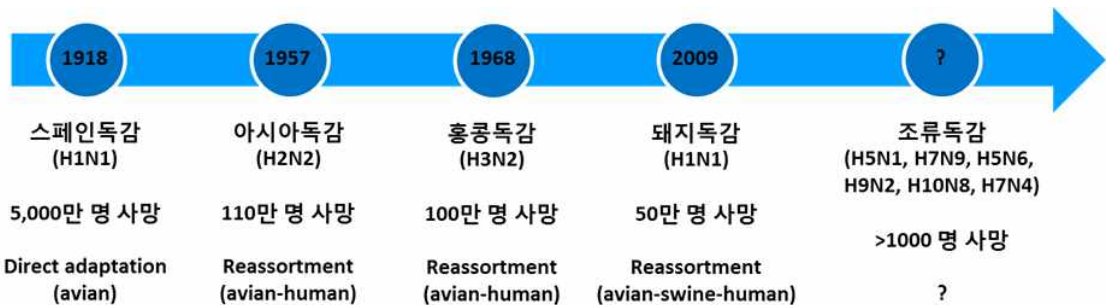


그림 6. Pandemic influenza A의 역사

- 예를 들어, 1997년부터 발견되기 시작한 조류인플루엔자 바이러스 H5N1은 야생 조류와 가금류에서 발병하여 사람에게 전파되었으며 2017년 10월까지 총 16개국에서 454명의 사망자(치사율 52.8%)를 발생시켰음. 2013년 중국에서 발생한 H7N9의 경우 2018년 1월까지 621명의 사망자(치사율 38.2%)를 발생시켰음 (그림 7)

항목	H5N1	H7N9	H5N6	H9N2	H10N8
발생 국가	전 세계 16개국 (동남아, 중동 지역)	중국, 홍콩, 대만, 말레이시아, 캐나다	중국	중국, 방글라데시, 이집트	중국
인체감염 발생 사례	2003~2017.10 확진 860명 사망 454명 52.8%	2013~2018.01 확진 1,624명 사망 621명 38.2%	2014~2017.12 확진 19명 사망 10명 52.6%	1998~2017.12 확진 34명 사망 1명 3.2%	2013.11~2014.02 확진 3명 사망 2명 66.6%
발생 양상	이집트, 인도네시아 풍토병 양상	계절적 유행 (10~4월)	산발적 발생	산발적 발생	산발적 발생

그림 7. 조류인플루엔자 국외 발생 현황 (질병관리본부, 한국)

- H7N9 인체감염은 2013년 이후 산발적이지만 지속적으로 일어나고 있어 중국 정부는 예방, 감시, 대유행을 대비한 지속적인 모니터링과 함께 H5, H7의 bivalent 백신을 가금류에 접종하고 있음
- 이 외에도 H5N6, H9N2, H10N8 등이 산발적으로 인체 감염된 사례가 보고되고 있으며, 2018년 2월 중국에서 H7N4형의 인체감염 사례가 보고되었음
- 사람 간 조류인플루엔자 바이러스의 전파 경로는 명확히 알려지지 않았으나, 동물실험에서 공기중 전파 가능성이 보도된 바 있음 (Science, 2012, 336:1534-41; Nature 2013, 501:556-9)
- 국내에서 조류인플루엔자 바이러스 인체감염 발생 사례는 아직까지 보고된 바 없으나, 국외의 사례를 기반으로 H5N1, H5N6, H7N9은 인체 감염의 잠재적 요인임

나. 조류인플루엔자 바이러스 유전체 분석의 기술 수준 및 현황

(1) 정밀검사법 개발의 필요성

- 조류인플루엔자 바이러스의 정밀 진단법은 계란을 이용한 바이러스 배양법, 혈구응집 억제시험법(HI), 면역형광법(IFA), 효소면역시험법(ELISA), 중합효소연쇄반응법(PCR) 등이 적용되고 있음
- 배양법과 혈구응집억제시험법은 민감도가 높고 정확하지만 상대적으로 많은 시간을 필요로 함
- 면역형광법과 효소면역시험법은 빠르지만 바이러스 배양법에 비해 민감도와 특이도가 낮다는 문제가 있음 (J. Virol. Methods 2002, 99:63-70)
- PCR 방법은 높은 민감도를 가지고 다량의 검체를 특이적이고도 빠르게 진단할 수 있다는 장점이 있기에 조류인플루엔자 바이러스 진단의 gold standard로 사용중임
- PCR 결과 고병원성 양성인 경우 고병원성 확인을 위해 염기서열분석을 통해 유전체를 분석 하고 있음. 따라서 시료 채취에서 HPAI 확진까지 4~7일이 소요됨 (그림 8)
- 하지만 PCR 방법은 간편성 및 현장성이 떨어져 현장에서 진단할 수 없다는 한계가 있으며, 기존의 PCR 기반의 신속/정밀검사 키트들은 검사 아형이 정해져 있음
- 예를 들어 국내에서 판매중인 PCR/real-time PCR키트는 H5만을 검출하거나 H5/N1 아형만의 검출이 가능하기에 새로운 아형의 검출이 원천적으로 불가능함
- RNA 바이러스 중합 효소의 높은 변이율은 인플루엔자 바이러스 유전자형을 자연 생태계에서 매우 가변적으로 만들고 있음. 이는 PCR 반응의 위음성 발생 가능성을 증가 시킴

고병원성 조류인플루엔자 검사체계도

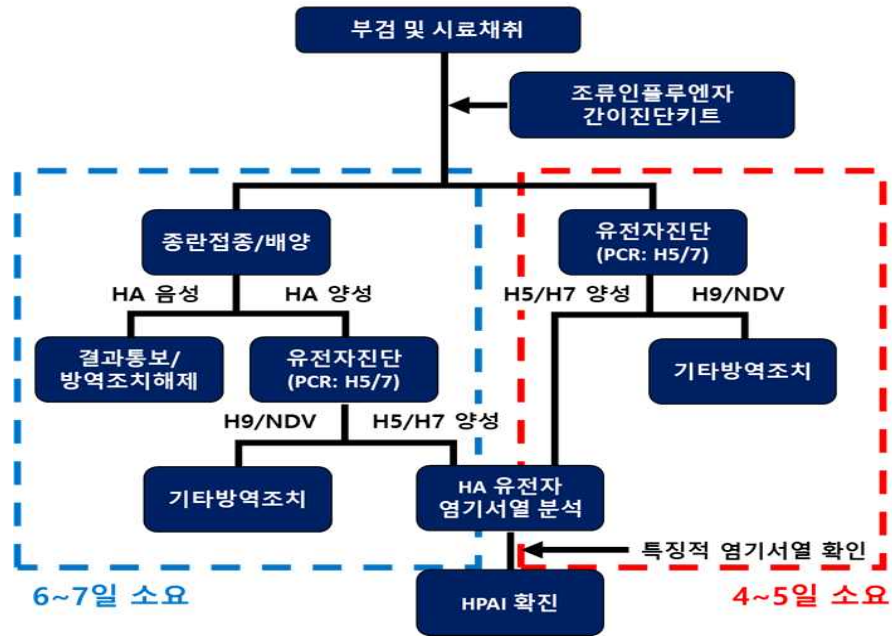


그림 8. 고병원성 조류인플루엔자 검사체계도

- 인플루엔자 바이러스는 서로 다른 바이러스 유전자 조각들의 재조합을 통해 진화 해 오고 있음. 실제, 고병원성 H7N9 바이러스는 오리의 HA 유전자, 야생조류의 NA 유전자 및 닭에서 나머지 6개 유전자가 재편성된 바이러스로 규명된 바 있음
- 하지만 PCR 방법으로는 조류인플루엔자 바이러스의 유전자 재편성 양상을 분석하는데 한계가 있음
- 따라서 특정 조류인플루엔자 바이러스의 공중보건 위험 평가를 위해서는 전장 유전체의 특성을 파악하는 것이 중요하지만, 현재 사용 중인 Sanger 시퀀싱은 전장유전체를 분석하기에 비용과 시간이 많이 필요로 함

(2) NGS기반 조류인플루엔자 정밀검사의 중요성

- 최근 차세대염기서열분석(NGS) 기술의 발전으로 데이터 생산 비용이 획기적으로 줄어들었음
- 인플루엔자 바이러스의 경우 8개 RNA 분절으로 구성되며 전장 유전체 크기는 약 13.5kb임
- 8개 RNA 분절의 양쪽 말단은 잘 보존된 염기서열이 존재하고 있으며, 이를 이용하여 한번의 PCR을 통해 8개 분절 모두를 증폭하면 효율적인 NGS 라이브러리의 구축이 가능함 (그림 9)

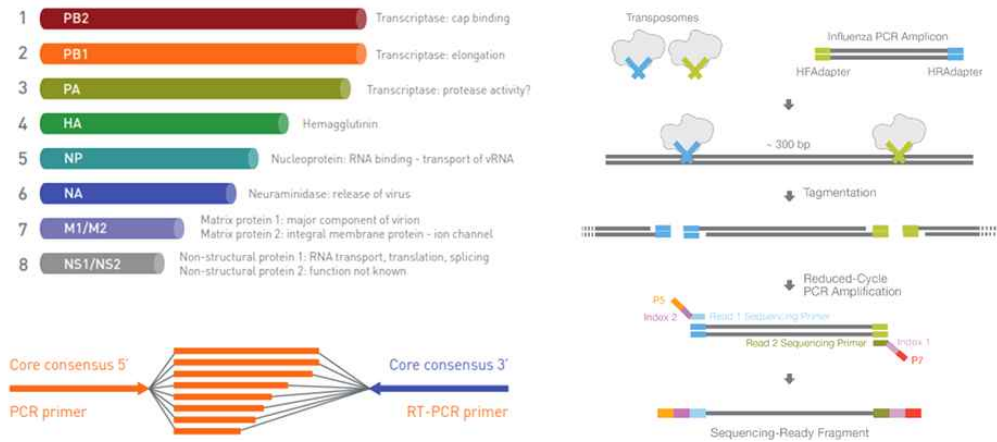


그림 9. 인플루엔자 A 바이러스 유전체 시퀀싱 전략

- 아래 그림은 NGS기반 조류인플루엔자 바이러스 정밀검사 과정을 나타내고 있으며, 하루 안에 RNA 추출에서 NGS 데이터 생산까지 가능함 (그림 10)

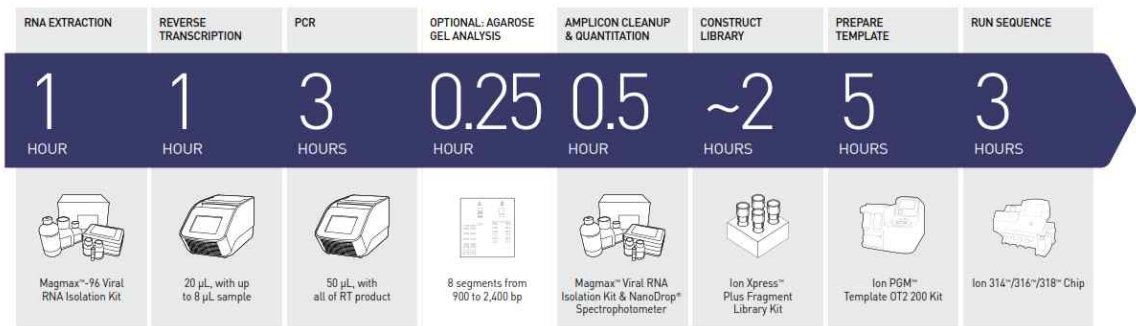


그림 10. NGS기반 조류인플루엔자 정밀검사 과정

- 또한, NGS 라이브러리 구축 및 시퀀싱 과정의 자동화를 통해 연구자 간 생산되는 데이터의 품질 관리가 용이함
- NGS를 통해 얻어진 데이터는 레퍼런스 지놈과 비교하여 아형 결정, 고병원성 여부, 유전자 재조합, 감염 숙주 범위, 바이러스 변이 및 진화 과정의 분석이 동시에 가능함 (그림 11)
- NGS기반 정밀검사를 통해 조류인플루엔자 바이러스의 유래를 규명하고 이를 통해 시간적, 지역적 이동 특성이 파악 가능함
- 또한 조류인플루엔자 바이러스의 전장유전체 정보는 야생조류에 의한 바이러스의 전파 여부를 밝히는데 중요한 정보임
- 유전자료, 유래 및 발생타입 등에 대한 시공간적 데이터베이스 구축을 통해 가금류의 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 발생 대응 및 관리대책 수립의 과학적 근거 제공이 가능함

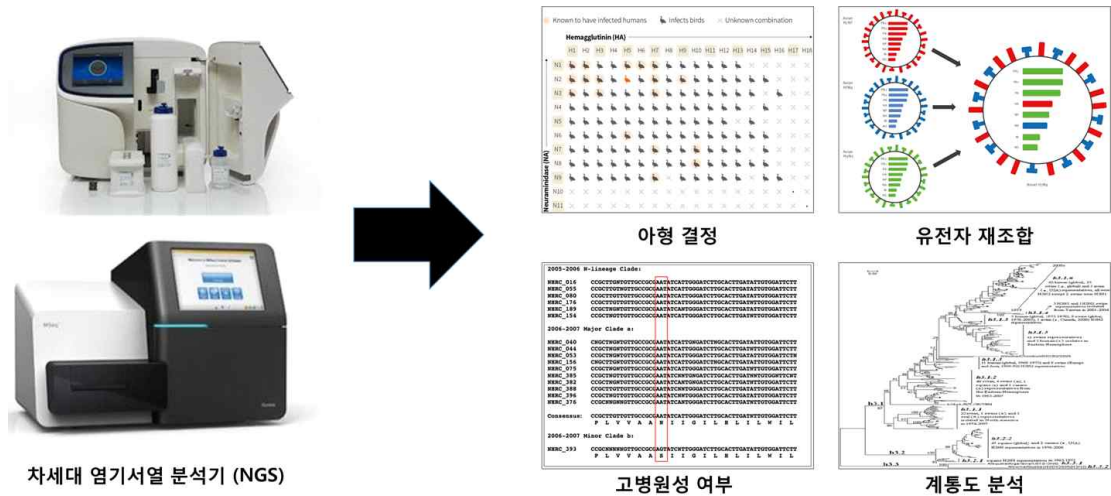


그림 11. NGS 기반 조류인플루엔자 바이러스 분석

다. 선행조사 및 예비연구 결과

(1) NGS기반 조류인플루엔자 정밀검사

- 장기간 보관된 가금류 시료에서 NGS기반 AIV 정밀검사 가능성을 확인하고자 하였음
- 시료에서 추출된 RNA를 주형으로 하여 8개 RNA 절편 모두를 대상으로 RT-PCR을 수행하였음. 사용된 프라이머에는 트랜스포솜(transposome)이 인식할 수 있는 인위적 염기서열이 포함됨 (그림 12)

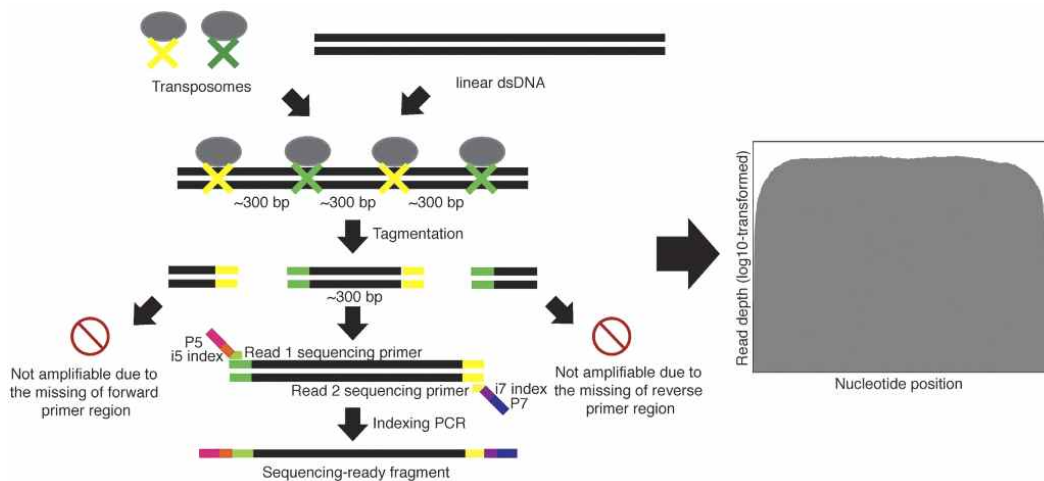


그림 12. 트랜스포솜을 이용한 NGS 라이브러리 구축 전략

- 구축된 NGS 라이브러리는 TapeStation과 같은 민감한 전기영동장치를 이용하여 라이브러리 구축 여부를 확인하였으며, 분석 결과 PB2, PB1, PA 등의 비교적 큰 크기의 분절이 적합하게 제작되지 않음을 확인하였음
- 이는 시료의 장기간 보관 과정 중 큰 RNA 분절에 단편화가 발생한 것으로 판단되며,

추후 시료준비 과정의 최적화가 필요할 것으로 판단됨

- 시퀀싱 데이터는 인플루엔자 A, B, C 지놈을 대상으로 alignment 되었으며, 인플루엔자 A에서 3000x이상의 커버리지로 데이터가 생성됨을 확인하였음. 인플루엔자 B, C는 확인되지 않았음 (그림 13)

Sample	Read#	Mapped reads (%)	Coverage
S1	2,610,854	2,280,913 (87.4%)	3,332
S2	2,942,367	2,768,651 (94.1%)	4,025
S3	2,914,551	2,623,924 (90.0%)	3,865

	S1	S2	S3
B-seg1	0	0	0
B-seg2	0	0	0
B-seg3	0	0	0
B-seg4	0	0	0
B-seg5	0	0	0
B-seg6	0	0	0
B-seg7	0	0	0
B-seg8	0	0	0
C-seg1	0	0	0
C-seg2	0	0	0
C-seg3	0	0	0
C-seg4	0	0	0
C-seg5	0	0	0
C-seg6	0	0	0
C-seg7	0	0	0

그림 13. NGS 데이터 alignment 예

- 아형 분석 결과 16개 HA 중 H5에만 특이적으로 시퀀스 리드들이 형성되었으며, 9개 NA 중에서는 N6만이 특이적 시퀀스 리드가 형성되어 H5N6형임을 확인함 (그림 14)

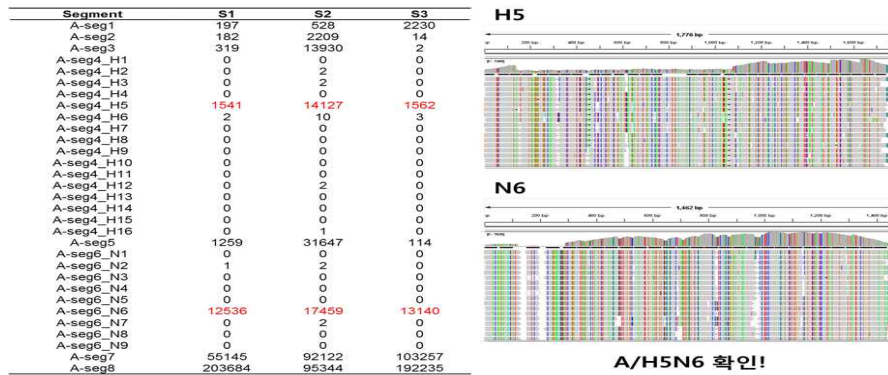


그림 14. NGS기반 아형 분석

- HA 절편의 cleavage site 분석 결과 “PLRERRRK-R/GLF” 임을 확인하였음 (그림 15). 이는 clade 2.3.4에 속하는 H5N6 아형과 일치함을 확인하였음

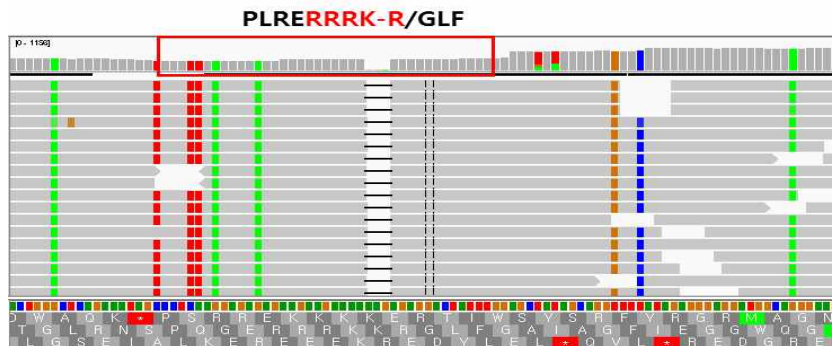


그림 15. HA 절편의 cleavage 분석 결과

- HA 유전자 염기서열을 기반으로 계통도 분석을 수행한 결과에서 분석한 검체는 2016년 국내에서 검출된 H5N6와 가장 유사성을 나타냈음 (그림 16)

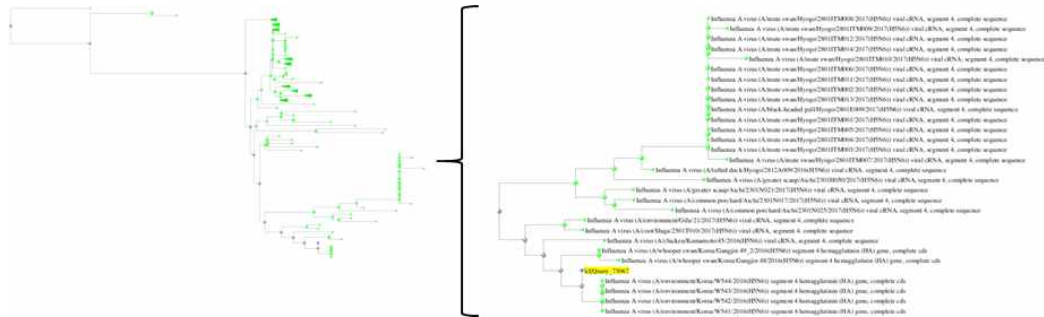


그림 16. HA 유전자 염기서열 기반 계통도 분석

(2) 등온증폭기반 현장진단기술 확립

- DNAzyme과 MB probe가 반응을 하여 검출을 할 수 있는지를 확인하기 위해 *Klebsiella pneumoniae*의 (*K. pneumoniae*)의 *phoE* 유전자를 타겟으로 DNAzyme을 설계하였음
- 먼저, 설계된 MB probe가 trigger 가 있는 경우에만 signal을 나타내는지 확인하였음
- Template 없이 DNAzyme과 MB probe를 넣었을 때 아무런 signal이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 이와 반대로 trigger를 임의로 넣어 준 경우 signal이 나타나는 것을 확인함으로써, DNAzyme이 template와 반응하여 trigger를 생성하는 않으면 반응이 진행되지 않음을 확인할 수 있었음 (그림 17)

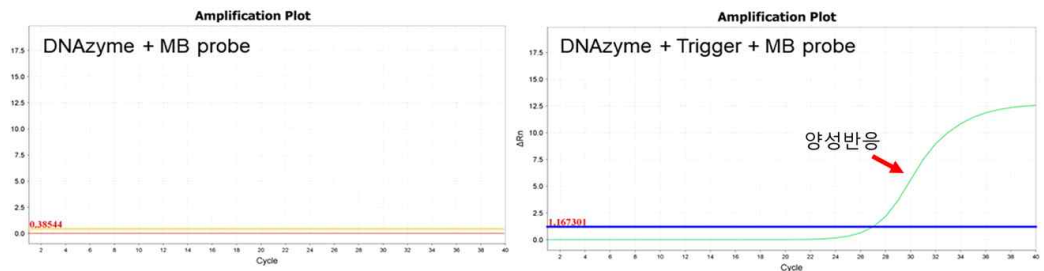


그림 17. 트리거의 유무에 의한 증폭 반응 비교

- *K. pneumoniae*의 *phoE* 유전자를 template로 하여 반응을 수행하였을 때, trigger를 따로 넣어 주지 않음에도 불구하고 MB probe의 signal이 나타나는 것을 확인하였음
- 이는 DNAzyme이 template와 반응하여 trigger를 생성해내고, 이 trigger가 MB probe와 반응하여 signal을 내는 것이라 판단함
- 타겟 유전자의 양적인 변화에 따른 검출 여부를 확인 한 결과, fmol 단위의 적은 양에도 약 1시간 정도의 시간 내에 원하는 유전자의 존재 유무를 확인할 수 있다는 결론을 내림 (그림 18)

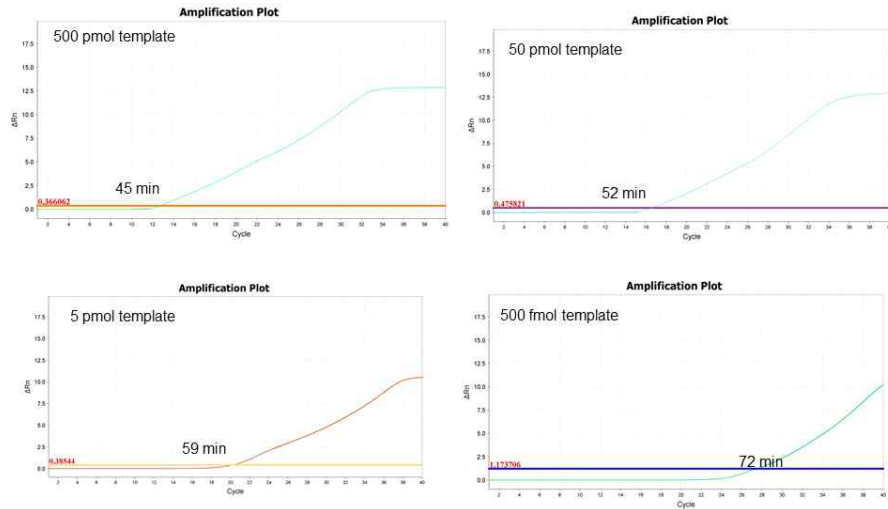


그림 18. 등온증폭 기술의 양적 검출한계 측정

제 3 절 연구개발 범위

가. 주관연구기관 (가톨릭대학교 산학협력단)

(1) 현장검체 대상 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산

- 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 조건 최적화를 위해 Illumina사의 트랜스포솜 기반 라이브러리 구축 방식과 Thermo Fisher Scientific사의 PCR 기반 라이브러리 구축 방식을 적용하여 데이터 생산함.
- 아래 그림은 두 방식의 원리를 나타내고 있음 (그림 19)

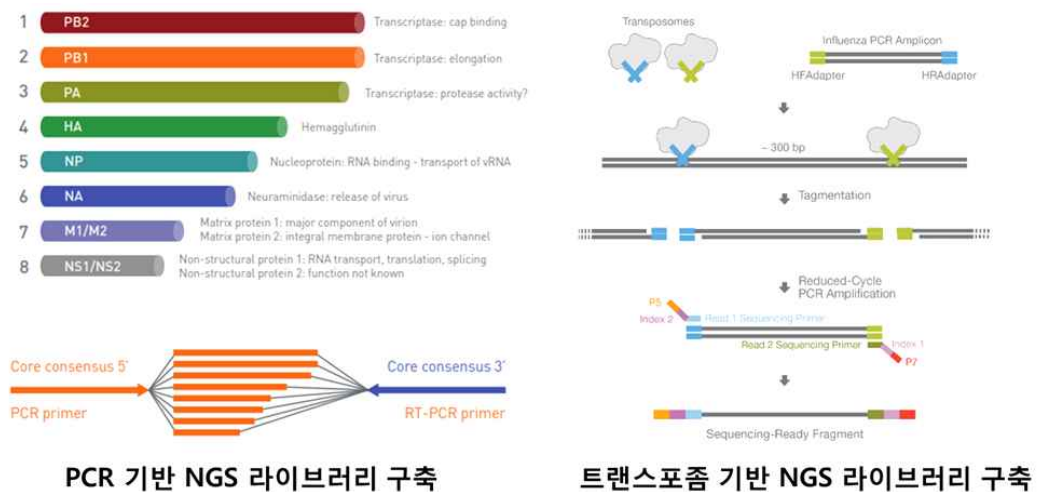


그림 19. NGS 라이브러리 구축 전략

- 두 가지 방식으로 생산된 NGS 데이터의 커버리지, 정확도, 염기서열 품질 등의 비교를 통해 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 생산조건을 최적화하며 이에 대한 표준운영

절차를 개발함

- 구축된 NGS 표준운영절차에 따라 현장검체 대상 NGS 데이터 생산
- 현장검체는 협동에서 수집한 검체를 활용함

(2) 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석

- NGS데이터 분석은 base calling, alignment 등의 여러 단계로 나뉘지며, 각 단계별 사용 가능한 알고리즘이 많이 개발되어 있음 (그림 20)



그림 20. NGS 데이터 분석 흐름

- 본 과제에서는 조류인플루엔자 바이러스 유전체 데이터 분석에 최적화된 파이프라인을 구축함
- NGS 분석이 익숙하지 못한 사용자를 위해 사용자 친화적 분석 소프트웨어를 개발함
- 확립된 분석 파이프라인 및 소프트웨어를 통해 현장에서 수거된 조류인플루엔자 바이러스의 아형, 고병원성 여부, 유전자 진화율, 진화 계통 및 유전자 재편성 양상을 분석

(3) 유전체 정보 기반 조류인플루엔자 상시감시체계 기술 개발

- 생산된 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보 데이터베이스 구축
- 구축하는 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보 데이터베이스는 MySQL을 기반으로 설계하며, 데이터베이스에는 검체의 수집 시기, 지역, 및 8개 segment 유전자 모두의 염기서열이 들어가도록 구축함
- 아래 그림은 유전체 데이터베이스 구축 사례를 나타내고 있음 (그림 21)

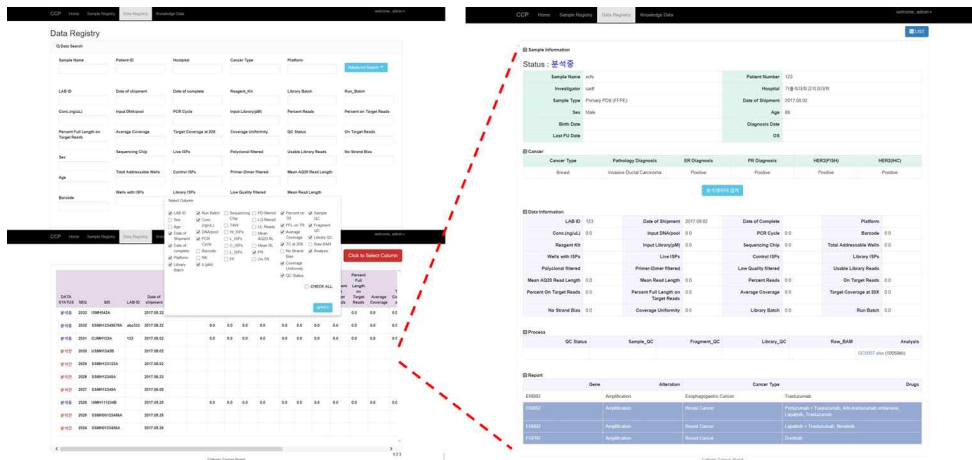


그림 21. 유전체 데이터베이스 구축 사례

(4) 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립

- 기존 현장진단키트의 문제점을 개선한 새로운 현장진단 분석 기술을 개발함
- 새로운 현장진단 분석 기술은 다음의 4가지 요구조건을 만족해야 함 (그림 22): 1)신속성 2)민감성 3)다양성 4)편리성



그림 22. 현장진단 분석 기술의 요구조건

- 이를 위해 LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 방식으로 조류인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있는 검사법을 개발함
- 검사법 개발 범위는 조류인플루엔자 바이러스 양성/음성을 확인할 수 있는 MP와 고병원성 판별을 위해 hemagglutinin H5, H9 및 neuraminidase N6를 대상으로 함
- 설계한 LAMP 프라이머의 검증을 위해 MP, H5, H9 및 N6의 분절 염기서열을 포함하는 클로닝 벡터를 구축함

나. 협동연구기관 (충청북도 동물위생시험소 중부지소)

(1) 검체 수집

- 조류인플루엔자 바이러스 전파경로 분석을 위해 충청북도 내 여러 지역에서 시료를 채취하며 이외의 지역에서 검체 확보는 유관기관과 협조하여 진행함
- 수집된 검체에서 rapid kit로 조류인플루엔자 바이러스 양성/음성 유무를 확인함
- 필요시 viral RNA를 추출하여 PCR등의 방법으로 조류인플루엔자 바이러스 양성/음성 유무를 확인함

(2) 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석

- 지역별 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 및 경로 분석
- 조류인플루엔자 바이러스 국내 전파양상 모델링

(3) 백신접종 영향 분석

- 조류인플루엔자 바이러스 백신접종 모델 확립
- 동물모델에 인플루엔자 바이러스를 노출시켜 임상 양상 확인 및 주기적 시료 채취
- 검체의 real-time PCR등의 정량분석을 수행하여 장기간 바이러스 순환 가능성 평가

(3) 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립

- 기존 현장진단키트의 문제점을 개선한 새로운 현장진단 분석 기술을 개발함
- 이를 위해 RPA (Recombinase polymerase amplification) 방식으로 조류인플루엔자를 검출할 수 있는 검사법을 개발함
- 검사법 개발 범위는 조류인플루엔자 바이러스 양성/음성을 확인할 수 있는 MP와 고병원성 판별을 위해 hemagglutinin H5, H9 및 neuraminidase N6를 대상으로 함

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 조류인플루엔자 바이러스 야외검체 확보

가. 야외 조류 분변에서 바이러스 검출

- 조류인플루엔자 바이러스는 원칙적으로 조류에 감염, 폐사를 일으키는 질병이지만 장기간 사람이나 다른 포유류가 장기간 조류 인플루엔자 바이러스에 노출되면 증상이 발현될 수 있음
- 1990년대 부터 시작된 공장식 가금류 사육은 대규모 조류 인플루엔자 발생과 매우 밀접한 관계가 있으며 특히 우리나라처럼 면적이 좁은 곳에서 생산성 향상을 위한 공장식 사육은 조류인플루엔자 바이러스에 매우 취약하며 이에 대한 대책이 절실함
- 조류인플루엔자 바이러스를 분리하기 위하여 음성 118건, 충주 92건, 제천 20건, 청주 15건, 괴산 15건, 진천 10건, 증평 5건, 피산 15건, 진천 10건, 증평 5건의 야외시료를 수거하였음 (그림 23)

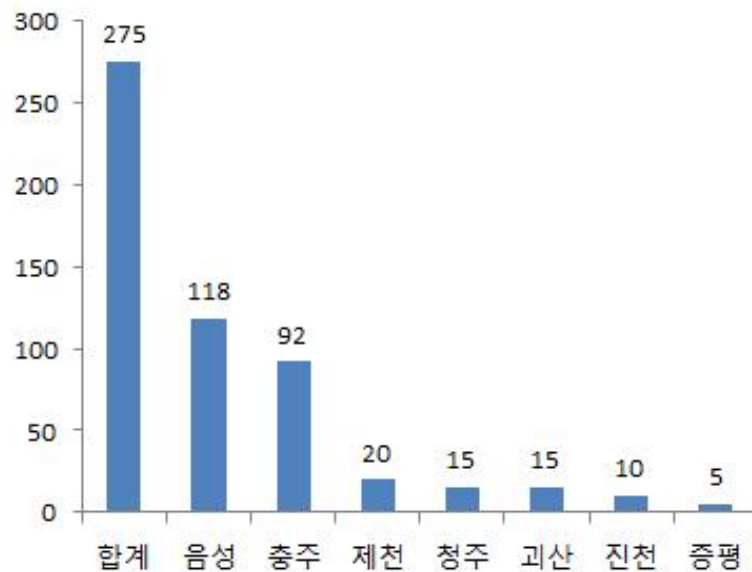


그림 23. 지역별 야외 샘플 수거 현황

- 야외 시료를 부화란에 접종하여 검사한 결과 총 22건의 바이러스가 분리되었음. 따라서 조류인플루엔자 바이러스 검출은 전체 275건 중에서 22건으로 검출율은 8% 로 확인되었음
- 이 중, 음성지역에서 16건으로 전체 양성률의 73%, 충주지역에서 6건으로 바이러스가 분리되어 27%로 확인되었음 (그림 24)

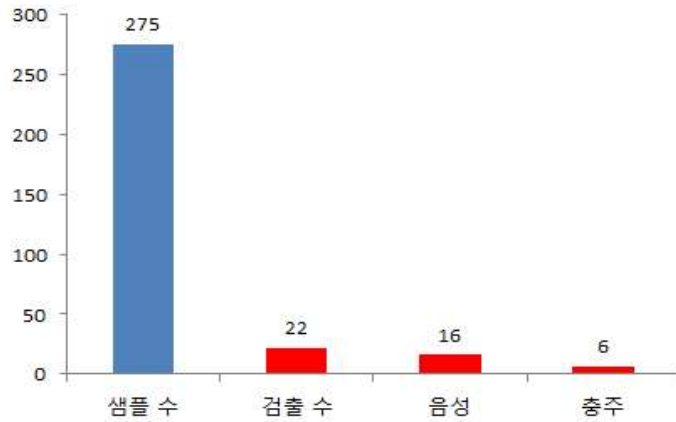


그림 24. 조류인플루엔자 바이러스 양성 검체 수

나. 검체 전처리

- 현장에서 수득한 현장검체는 PureLink viral RNA/DNA mini kit를 사용하여 조류인플루엔자 바이러스의 RNA를 분리하였음
- 분리된 viral RNA에서의 cDNA 합성은 Superscript III one-step RT-PCR system 을 사용하였으며 시약 조성은 아래 표와 같음 (표 1)

표 1. 조류인플루엔자 바이러스 cDNA 합성을 위한 시약 조성

	Note	Stock	Final	Add
Template		RNA extract	500ng - 1ug	10
Reaction Mix		2X	1X	25
Primer mix	T_AIV_sense	5 umol/L	0.3 pmol/μL	3
	T_AIV_antisense			
Enzyme Mix				1
RNase-free water				11
Total				50

- 조류인플루엔자 바이러스 cDNA 합성을 위한 반응 조건은 아래 표와 같음 (표 2)

표 2. 조류인플루엔자 바이러스 cDNA 합성을 위한 반응 조건

cDNA synthesis and denaturation		PCR amplification		Final extension	Hold
1 Cycles		5 Cycles	25 Cycles	1 Cycles	1 Cycles
45°C / 30min	95°C / 1min	95°C / 15sec	95°C / 15sec	68°C / 10min	4°C / ∞
		47°C / 30sec	57°C / 30sec		
		68°C / 3min	68°C / 3min		

- Tapestation이나 전기영동을 이용하여 아래와 같이 증폭 되었는지 QC를 진행함. 아래 그림은 cDNA 합성 후 전기영동 예를 나타내고 있음 (그림 25)

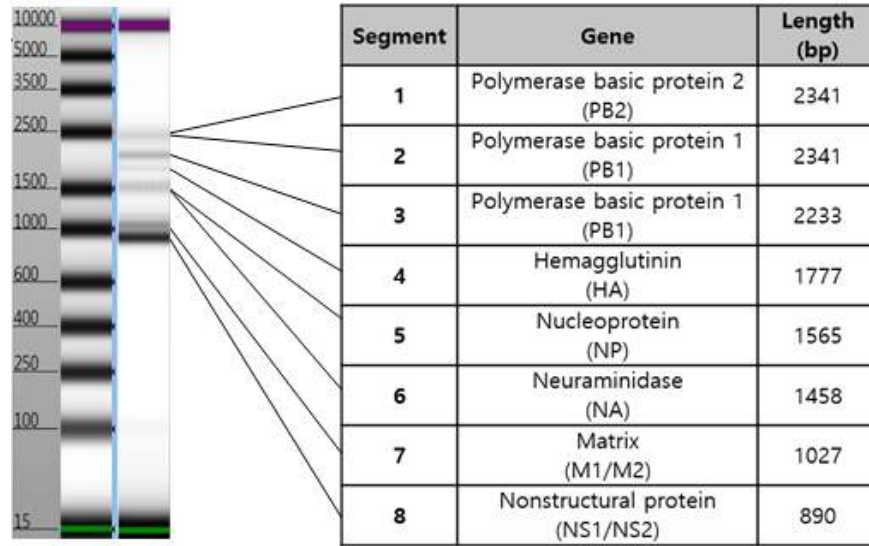


그림 25. 조류인플루엔자 바이러스 cDNA 합성 결과

제 2 절 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 생산조건 확립

가. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 조건 확립

- 현장검체에서 viral RNA 추출법 및 NGS 데이터 생산 조건을 확립하기 위하여 트랜스포존 방식의 NGS 실험 및 PCR 기반의 NGS 실험을 수행하였음
- 트랜스포존 방식의 분석을 진행하기 위해 조류인플루엔자의 8개 단편을 모두 증폭할 수 있는 어댑터와 프라이머를 설계하였으며 그 염기서열은 다음과 같음 (표 3)

표 3. 트랜스포존 기반 조류인플루엔자 증폭 프라이머 서열

Name	Sequence
HFAdapter	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCAAAAGCAGG
HRAdapter	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTAGA AACAAGG
HF	TGTATAAGAGACAGAGCAAAAGCAGG
HR	TGTATAAGAGACAGAGTAGAAACAAGG

- 현장검체에서 추출한 RNA를 Superscript one-step RT-PCR 시스템과 상기 설계한 프라이머/어댑터를 이용하여 증폭하였음. 아래 그림은 증폭 산물을 전기영동으로 확인한 결과를 나타내며 현

장검체 중 일부 시료에서 단편의 크기가 큰 PB2, PB1, PA의 증폭이 균일하지 않음이 확인되었음 (그림 26)

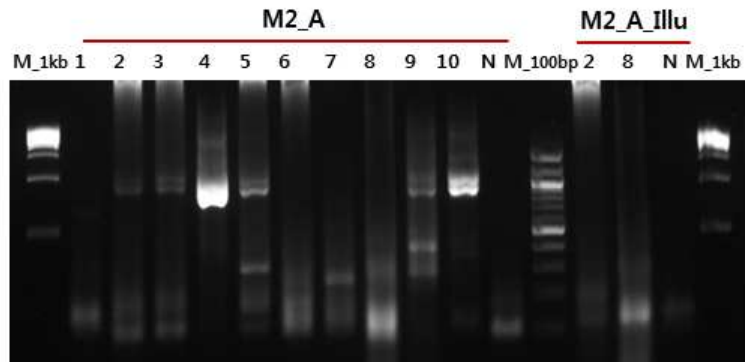


그림 26. 프랜스포존 기반 ER-PCR 수행 결과

- RT-PCR 증폭산물은 일루미나의 Nextera NGS library preparation 키트를 이용하여 라이브러리를 제작하였으며, 그 원리를 아래 그림에 나타냈음 (그림 27)

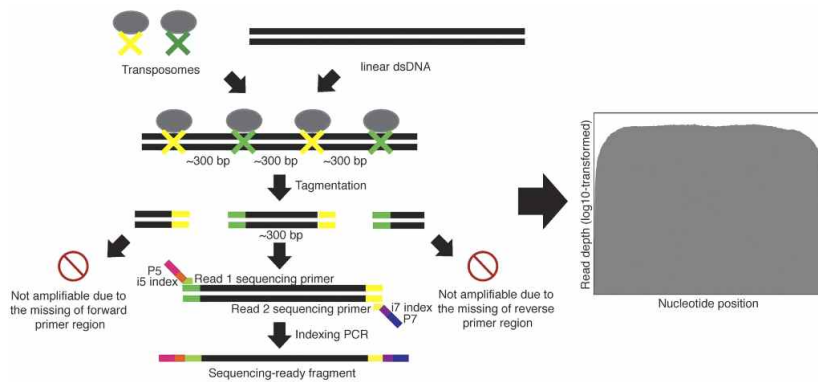


그림 27. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 개요

- 제작된 라이브러리는 TapeStation장비를 통해 질평가를 수행하였으며, 사용한 증폭산물의 양을 달리하여 (0.1ng, 0.5ng, 1ng) 라이브러리를 제작한 결과 0.1ng의 증폭산물을 사용한 경우 가장 효율적인 성능을 나타냈음 (그림 28)

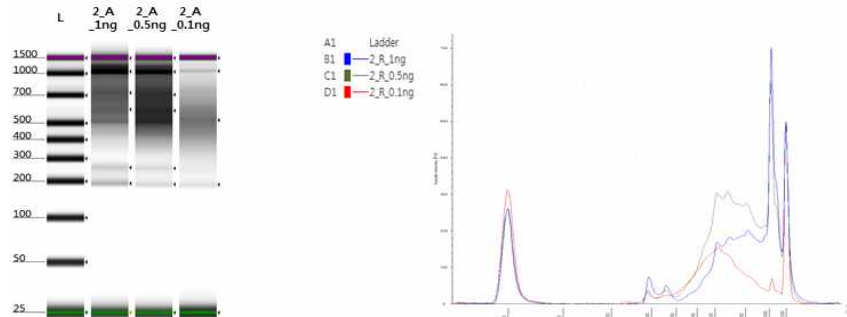


그림 28. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 제작 조건 최적화

- 제작된 라이브러리는 일루미나의 MiSeq장비를 이용하여 염기서열 분석을 진행하였으며, 1000~4500 depth의 NGS 데이터가 생성됨을 확인하였음
- 상기 과정을 통해 트랜스포존 기반의 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 생산조건을 최적화 하였으며, 이에 대한 표준운영절차(SOP)를 개발하였음 (그림 29 - 그림32)

트랜스포존 기반 조류인플루엔자 바이러스 NGS Library 구축을 위한 표준운영절차

실험 시작 전 정보

- 오염방지를 위해 필터 팁을 사용하여 진행한다.
- 모든 시약은 얼음 위에서 녹여 진행한다.
- AMPure XP Reagent beads는 사용 하기 30분 전 상온에 꺼내둔다.
- 70% ETOH는 당일 만든 것만 사용한다.
- 중독 과정이 있는 모든 실험은 얼음 위에서 진행 되어야한다.
- Elution 후에는 항상 얼음 위에서 보관하여야 한다.
- Nextera™ DNA Flex Library Prep 시약정보

Acronyms	Definition
BLT	Bead Linked Transposome
EPM	Enhanced PCR Mix
RSB	Resuspension Buffer
SPB	Sample Purification Beads
TB1	Tagmentation Buffer 1
TSB	Tagment Stop Buffer
TWB	Tagment Wash Buffer

● Covaris을 이용한 PCR product fragmentation

1. 1.5mL LoBind Tube에 아래와 같은 조건으로 PCR product을 100ng을 맞춘다.

Component	Amount
DNA	100ng
Low TE	Variable
Total	30µL

2. 아래의 조건을 Covaris에 설정하고 Covaris 전용 tube에 50µL 을 넣어 절편화한다.

Library size	Mean fragment size	Peak Incident Power (PIP)	Duty Factor	Cycles per burst	Treatment time(seconds)	Temp	Sample volume
200 bp	260 bp	50 W	20%	20% 200	130	20°C	50µL

3. Fragmentation 된 30µL PCR product를 1.5-mL LoBind Tube로 옮겨 담는다.

그림 29. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-1

● Tagment Genomic DNA

1. 1.5 mL LoBind Tube 튜브에 한 샘플당 BLT(Bead-Linked Transposomes) 11 μ L, TB1 (Tagmentation Buffer 1) 11 μ L 양의 시약을 넣어 vortex mixer를 이용하여 짧게 섞어 Tagment 혼합액을 만든다.
2. Fragmentation 된 샘플 30 μ L(100ng)와 Tagment 혼합액 20 μ L 와 0.2mL PCR tube에 넣어 파이펫으로 섞어준다.
3. PCR 기기에 55°C 15분, 10°C Hold 로 설정하여 샘플과 Tagment 혼합액이 들어가 있는 0.2mL PCR tube을 넣어준다.

● Post Tagmentation Cleanup

1. 1.5 mL LoBind Tube 튜브에 Tagmentation 된 샘플에 10 μ L TSB (Tagment Stop Buffer) 를 넣고 파이펫을 이용하여 천천히 섞어준다.
2. Magnetic separator에 TSB가 들어있는 tube를 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분 간 기다린다.
3. Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다. (용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
4. Tube를 Magnetic separator에 분리시킨 상태에서 TWB (Tagment Wash Buffer) 100 μ L를 넣는다.
5. TSB와 TWB가 잘 섞이도록 파이펫으로 천천히 섞어준다.
6. Magnetic separator에 tube를 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3분간 기다린다.
7. Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다. (용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
8. STEP 4 – 7 두 번 더 반복한다.
9. Tube를 한 번 더 원심분리 한 후, Magnetic separator에 Tube를 꽂아 남은 ethanol를 제거한다

● Amplify Tagmented DNA

1. 아래의 조건으로 Amplify 혼합액을 만든 후 vortex mixer를 이용하여 섞어준다.

Component	Volume by Input gDNA
	100ng
EPM (Enhanced PCR Mix)	22 μ L
Nuclease-free water	22 μ L
Total	44 μ L

그림 30. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-2

* 모든 시약은 얼음 위에서 녹여야 한다.

2. Post Tagmentation Cleanup의 step 9 로 이동하여, Magnetic separator에서 Tube를 분리하여 Amplify 혼합액 40 μ L을 넣어준다.
3. plate shaker에서 1600 rpm 으로 1분동안 유지한 후 짧게 원심분리를 한다.
4. 각 샘플에 다른 종류의 i5 adapter: 5 μ L i7 adapter: 5 μ L 전체 10 μ L를 넣어준다.
5. plate shaker에서 1600 rpm 으로 1분동안 유지한 후 짧게 원심분리를 한다.
6. 아래의 조건으로 PCR 기기를 설정하고 0.2-mL PCR tubes을 넣고 증폭을 진행한다.

Step	Temperature	Time
tep1	68°C	3 minutes
Step2	98°C	3 minutes
Step3 (5cycle)	98°C	45 seconds
	62°C	30 seconds
	68°C	2 minutes
Step4	68°C	1 minutes
Step5	10°C	Hold

* STOPPING POINT 연속하여 다음과정으로 진행하지 않을 경우 -20°C에 보관한다.

● Clean Up Libraries

1. Amplify가 끝난 샘플들을 Magnetic separator에 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
2. Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 상층액 45 μ L 을 새로운 tube에다가 옮긴다.
(용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
3. 상층액 45 μ L 을 옮긴 tube에 nuclease-free water 40 μ L을 넣어준다.
4. 45 μ L SPB (Sample Purification Beads)를 넣고 1600 rpm 으로 1분동안 유지한 후 짧게 원심분리를 한다.
5. 5분동안 상온에서 유지한다.
6. 5분 후 샘플들을 Magnetic separator에 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
7. 용액이 투명해질 동안 새로운 tube에 15 μ L SPB을 분주하여 넣어준다.
8. 용액이 투명해 졌을 때, Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 상

그림 31. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-3

- 중액 125 μ L을 15 μ L SPB가 들어있는 새로운 tube에다 옮긴다.
9. plate shaker에서 1600 rpm 으로 1분동안 유지한 후 짧게 원심분리를 한다.
 10. 5분동안 상온에서 유지한다.
 11. 5분 후 샘플들을 Magnetic separator에 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
 12. Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다 (용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
 13. Magnetic separator에 고정시킨 상태에서 80 % Ethanol 200 μ L를 넣는다.
 14. 30초 동안 상온에서 유지 한 후, Ethanol을 제거한다
 15. STEP 14 – 15을 한 번 더 반복한다.
 16. Tube를 한 번 더 원심분리 한 후, Magnetic separator에 Tube를 꽂고 남은 ethanol을 제거한다
 17. 상온에서 2분 동안 드라이 시키거나 남아 있는 Ethanol이 완전히 증발될 때까지 Tube 의 두껍을 연 채로 드라이 시킨다 (Bead pellet이 과도하게 드라이 되면 elution 의 효율 이 저하되기 때문에 Crack 이 생길 때까지 드라이 하지 않는다.)
 18. 32 μ L RSB (Resuspension Buffer)을 넣고 파이펫으로 섞어준 후 짧게 전기영동한다.
 19. 상온에서 2분 유지한다.
 20. 2분 후 Magnetic separator에 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
 21. Library인 상중액 30 μ L 을 새로운 tube에 옮겨 담는다.
- * STOPPING POINT 연속하여 다음과정으로 진행하지 않을 경우 -20°C에 보관한다.**

그림 32. 트랜스포존 기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-4

나. PCR 기반 NGS 라이브러리 구축 조건 확립

- PCR 기반의 AIV NGS 생산 조건을 확립하기 위하여 조류인플루엔자의 8개 단편을 모두 증폭할 수 있는 프라이머를 설계하였으며 그 염기서열은 다음과 같음 (표 4)

표 4. PCR기반 조류인플루엔자 증폭 프라이머 서열

Name	Sequence
Sense	CTGGATACGCCAGCRAAAGCAGG
Antisense	GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGG

- 프라이머 설계시 변이가 높은 염기는 mixed base가 합성될 수 있도록 하여 증폭 효율을 높이고자 하였음
- 앞서 확립한 트랜스포솜 방식에 비해 어댑터 시퀀스가 없고 mixed base가 포함되도록 설계하였기에 동일한 RT-PCR 시스템을 사용하여 28 cycle로 조건을 변경했음에도 충분한 증폭산물이 생성됨을 확인하였음
- 증폭 산물은 TapeStation 시스템을 이용하여 질평가를 수행하였으며, 기존 트랜스포솜 방식에 비해 PB2, PB1, PA 단편의 증폭이 균일하게 이루어짐을 확인하였음 (그림 33)

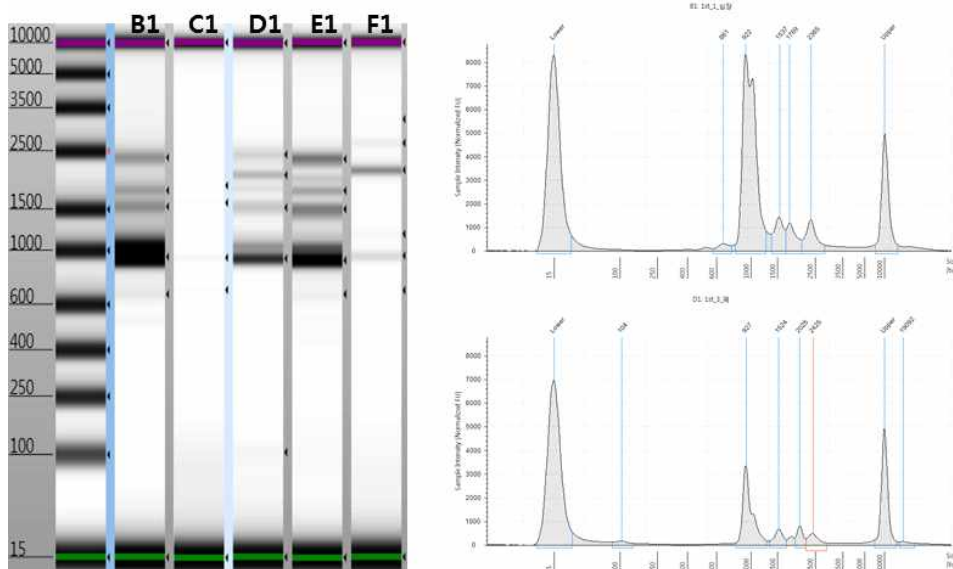


그림 33. PCR기반의 RT-PCR 질평가 결과

- RT-PCR 증폭 산물은 Covaris 장비를 사용하여 200~260bp 크기의 단편으로 절편화를 진행하고 ThermoFisher사의 Ion Plus Fragment Library 키트를 사용하여 NGS 라이브러리를 제작하였음.

제작된 라이브러리는 size selection을 수행하여 정제하였음

- 제작된 라이브러리는 ThermoFisher사의 IonS5장비를 이용하여 염기서열 분석을 진행하였으며, 900~3500 depth의 NGS 데이터가 생성됨을 확인하였음
- 상기 과정을 통해 PCR기반의 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 생산조건을 최적화 하였으며, 이에 대한 표준운영절차(SOP)를 개발하였음 (그림 34 - 그림 41)

PCR기반 조류인플루엔자 바이러스 NGS Library 구축을 위한 표준운영절차

실험 시작 전 정보

- 오염방지를 위해 필터 팁을 사용하여 진행한다.
- 모든 시약은 얼음 위에서 녹여 진행한다.
- AMPure XP Reagent beads는 사용 하기 30분 전 상온에 꺼내둔다.
- 70% ETOH는 당일 만든 것만 사용한다.
- 중독 과정이 있는 모든 실험은 얼음 위에서 진행 되어야한다.
- Elution 후에는 항상 얼음 위에서 보관하여야 한다.

● Covaris을 이용한 PCR product fragmentation

1. 1.5mL LoBind Tube에 아래와 같은 조건으로 PCR product을 100ng을 맞춘다.

Component	Amount
DNA	100ng
Low TE	Variable
Total	50µL

2. 아래의 조건을 Covaris를 설정하고 Covaris 전용 tube에 50µL 을 넣어 fragmentation시킨다.

Library size	Mean fragment size	Peak Incident Power (PIP)	Duty Factor	Cycles per burst	Treatment time(seconds)	Temp	Sample volume
200 bp	260 bp	50 W	20%	20% 200	130	20°C	50µL

3. Fragmentation 된 50µL PCR product를 1.5-mL LoBind Tube로 옮겨 담는다.

그림 34. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-1

● End-repair

1. 아래의 조건에 맞게 시약들을 혼합하여 End-repair 혼합액을 만들어준다.

Component	Volume by Input
	100 ng
Fragmented DNA	50 μ L
5X End Repair Buffer	20 μ L
End Repair Enzyme	1 μ L
Nuclease-free water	29 μ L
Total	100 μ L

* 모든 시약은 얼음 위에서 녹여야 한다.

2. Fragmentation 된 50 μ L PCR product에 End-repair 혼합액 50 μ L을 넣고 파이펫을 이용하여 섞어 준다.
3. 20분동안 상온에 유지시킨다.
4. AMPure XP Reagent beads 180 μ L을 Fragmentation 된 PCR product에 넣은 후 잘 섞이도록 vortex mixer를 이용하여 섞어준다. 그 다음 짧게 원심분리 한 후, 상온에서 5분간 유지한다. * Bead를 실험 시작하기 30분 전에 상온에 꺼내 둔다
5. Magnetic separator에 bead가 들어있는 tube를 꽂고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
6. Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다 (용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
7. Tube를 Magnetic separator에 고정시킨 상태에서 70 % Ethanol 500 μ L를 넣는다.
8. 30초 동안 상온에서 유지 한 후, Ethanol을 제거한다 (Ethanol을 제거하는 동안 Magnetic 에 붙어있는 Beads를 건드리지 않도록 한다)
9. 70% ethanol wash를 한 번 더 반복한다. (step 7-8)

그림 35. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-2

10. Tube를 원심분리 한 후, Magnetic separator에 Tube를 꽂고 남은 ethanol를 제거한다
11. 상온에서 2분 동안 드라이 시키거나 남아 있는 Ethanol이 완전히 증발될 때까지 Tube 의 뚜껑을 연 채로 드라이 시킨다
(Bead pellet이 과도하게 드라이 되면 elution의 효율이 저하되기 때문에 Crack 이 생길 때까지 드라이 하지 않는다).
12. Tube에 27 μ L Low TE를 넣고, 잘 섞이도록 Tube를 vortex mixer를 이용하여 섞어주거나 Tapping 한다. Bead가 Low TE에 완전히 용해되도록 섞어준다.
13. 짧게 원심 분리 한 후 상온에서 2분간 유지한다.
14. Magnetic separator에 Tube를 꽂고 bead와 용액이 분리되어 투명해 질 때까지 약 2분간 기다린다.
15. 새로운 1.5 mL LoBind Tube에 상층액 27 μ L을 취해 넣고 다음 단계를 위해 상층액을 보관 한다.

* STOPPING POINT 연속하여 다음과정으로 진행하지 않을 경우 -20°C 에 보관한다.

● Ligate adapters, nick-repair, and purify the ligated DNA

1. 아래의 조건에 맞게 시약들을 조합하여 Ligate 혼합액을 만들어준다.

Component	Volume by Input gDNA
	50-100ng
DNA	25 μ L
10X Ligase Buffer	10 μ L
Ion P1 Adapter	2 μ L
Ion Xpress™ Barcode X	2 μ L
dNTP Mix	2 μ L
Nuclease-free Water	49 μ L
DNA Ligase	2 μ L

그림 36. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-3

Nick Repair Polymerase	8 μ L
Total	100 μ L

* 모든 시약은 얼음 위에서 녹여야 한다.

- 0.2mL PCR tube에 End repair 된 25 μ L DNA와 Ligate 혼합액 75 μ L 을 넣고 파이펫으로 잘 섞어준다.
- 아래의 조건으로 PCR기기에 넣어준다.

Stage	Temperature	Time
Hold	25°C	15 minutes
Hold	72°C	5 minutes
Hold	4°C	Hold[1]

- 위의 조건이 완료되면 1.5-mL LoBind Tube에 옮겨 담아준다.
- AMPure XP Reagent beads 120 μ L을 Ligation된 샘플에 넣어 준다.
* Bead를 실험 시작하기 30분 전에 상온에 꺼내 둔다
- vortex mixer를 이용하여 섞어준 후 짧게 원심분리한다.
- 상온에서 5분간 유지한다.
- Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다
(용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다)
- Tube를 Magnetic separator에 고정시킨 상태에서 70 % Ethanol 500 μ L를 넣는다.
- 30초 동안 상온에서 유지 한 후, Ethanol을 제거한다
(Ethanol을 제거하는 동안 Magnetic 에 붙어있는 Beads를 건드리지 않도록 한다)
- 70% ethanol wash를 한 번 더 반복한다. (step 9 - 10)
- Tube를 원심분리 한 후, Magnetic separator에 Tube를 꽂고 남은 ethanol를 제거한다

그림 37. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-4

13. 상온에서 2분 동안 드라이 시키거나 남아 있는 Ethanol이 완전히 증발될 때까지 Tube 의 뚜껑을 연 채로 드라이 시킨다
(Bead pellet이 과도하게 드라이 되면 elution의 효율 이 저하되기 때문에 Crack 이 생길 때까지 드라이 하지 않는다.)
14. Tube에 27 μ L Low TE를 넣고, 잘 섞이도록 Tube를 vortex mixer를 이용하여 섞어주거나 Tapping 한다. Bead가 Low TE에 완전히 용해되도록 섞어준다.
15. 짧게 원심 분리 한 후 상온에서 2분간 유지한다.
16. Magnetic separator에 Tube를 꽂고 bead와 완성된 library가 분리되어 투명해 질 때까지 약 2분간 기다린다.
17. 상층액인 library 25 μ L을 새로운 1.5 mL LoBind Tube에 넣고 얼음 위에서 보관한다.

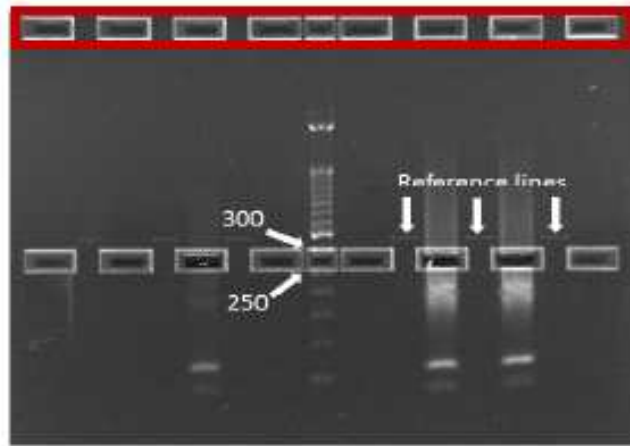
* STOPPING POINT 연속하여 다음과정으로 진행하지 않을 경우 -20°C 에 보관한다.

● Size-select the library with the E-Gel™ SizeSelect™ Agarose Gel

1. DNA ladder를 사용하기 전 vortex mixer를 이용하여 짧게 섞어주고 원심분리 해준다.
2. 1.5 mL tube에 ladder 1 μ L, loading Buffer 5 μ L, Nuclease-free water 44 μ L을 넣어 ladder 혼 합액을 만들고 vortex mixer를 이용하여 짧게 섞어주고 원심분리 해준다.
3. library sample 22.5 μ L와 Loading Buffer 2.5 μ L을 한 튜브에서 파이펫을 이용하여 섞어준다.

그림 38. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-5

- E-Gel agarose gel의 well에 DNA ladders와 library sample 25 μ L을 밑의 빨간색 부분에 넣어준다.



- E-Gel agarose gel에 DNA ladders와 library sample을 넣고 남은 모든 well에 Nuclease-free water 25 μ L로 채워준다
- 실행 버튼을 눌러 전기영동을 시작한다.
- Ladder가 아래 그림과 같이 250bp와 300bp 사이에 왔을 때 전기영동을 멈추고 밑에 파란색 부분에 Nuclease-free water가 들어 가있던 Well에 Nuclease-free water를 제거하고 다시 Nuclease-free water 25 μ L를 넣어준다.

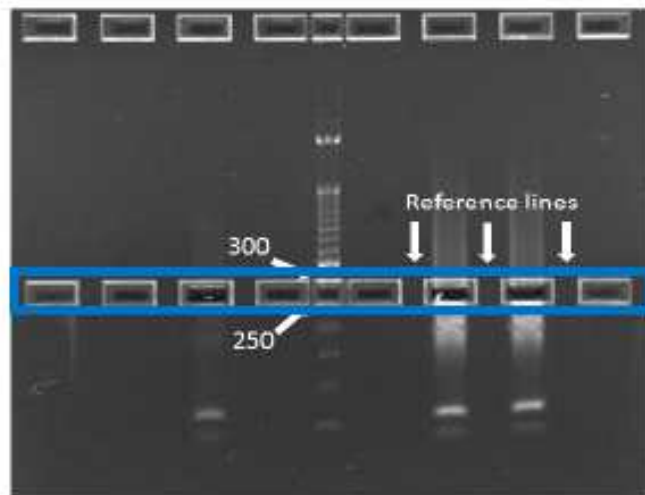


그림 39. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-6

- Ladder가 300bp가 약 250bp까지 내려갔을 때 다시 전기영동을 멈추고 25 μ L Nuclease-free water를 회수하여 새로운 1.5 mL LoBind Tube에 넣고 얼음 위에서 보관한다.

● Amplify and Purify the library

- 아래의 조건으로 Amplify 혼합액을 만들어준다.

Component	Volume by Input gDNA
	50-100ng
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	100 μ L
Library Amplification Primer Mix	5 μ L
Unamplified library	25 μ L
Total	130 μ L

* 모든 시약은 얼음 위에서 녹여야 한다.

- 0.2mL PCR tubes에 Size selection 된 샘플 25 μ L와 Amplify 혼합액 105 μ L 를 넣고 파이프 등으로 잘 섞어준다.
- 아래의 조건으로 PCR 기기를 설정하고 0.2-mL PCR tubes을 넣고 Amplify를 진행한다.

Stage	Step	Temperature	Time
Holding	Denature	95°C	5 minutes
8 Cycling	Denature	95°C	15 seconds
	Anneal	58°C	15 seconds
	Extend	70°C	1 minute
Holding	—	4°C	Hold

- Transfer the entire reaction 위의 조건이 완료되면 1.5 mL LoBind Tube에 옮겨 담아준다.
- AMPure XP Reagent beads 156 μ L을 Fragmentation 된 PCR product에 넣어준다.
* Bead를 실험 시작하기 30분 전에 상온에 꺼내 둔다
- 잘 섞이도록 vortex mixer를 이용하여 섞어준 후, 짧게 원심분리를 한다.

그림 40. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-7

- 7 상온에서 5분간 유지한다.
- 8 Magnetic separator에 bead가 들어있는 tube를 콧고 용액이 투명해질 때까지 약 3~5분간 기다린다.
- 9 Magnetic separator에 tube를 고정시킨 상태로 bead를 제외한 투명한 용액을 제거한다.
(용액을 제거하는 동안 Magnetic에 붙어있는 Beads 를 건드리지 않도록 한다.)
- 10 Tube를 Magnetic separator에 고정시킨 상태에서 70 % Ethanol 500 μ L를 넣는다.
- 11 30초 동안 상온에서 유지 한 후, Ethanol을 제거한다
(Ethanol을 제거하는 동안 Magnetic 에 붙어있는 Beads를 건드리지 않도록 한다)
- 12 70% ethanol wash를 한 번 더 반복한다. (step 10 - 11)
- 13 Tube를 원심분리 한 후, Magnetic separator에 Tube를 콧고 남은 ethanol를 제거한다
- 14 상온에서 2분 동안 드라이 시키거나 남아 있는 Ethanol이 완전히 증발될 때까지 Tube 의 뚜껑을 연 채로 드라이 시킨다
(Bead pellet이 과도하게 드라이 되면 elution 의 효율 이 저하되기 때문에 Crack 이 생길 때까지 드라이 하지 않는다.)
- 15 Tube에 20 μ L Low TE를 넣고, 잘 섞이도록 Tube를 vortex mixer를 이용하여 섞어주거나 Tapping 한다. Bead가 Low TE에 완전히 용해되도록 섞어준다.
- 16 짧게 원심 분리 한 후 상온에서 2분간 유지한다.
- 17 Magnetic separator에 Tube를 콧고 bead와 용액이 분리되어 투명해 질 때까지 약 2분간 기다린다.
- 18 새로운 1.5 mL LoBind Tube에 상층액 20 μ L를 취해 넣고 다음 단계를 위해 상층액을 보관한다.

* STOPPING POINT 연속하여 다음과정으로 진행하지 않을 경우 -20°C 에 보관한다.

그림 41. PCR기반 NGS 라이브러리 구축 SOP-8

제 3 절 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 분석조건 확립

가. NGS데이터 분석조건 확립

- 생산된 AIV의 NGS데이터의 분석조건을 확립하기 위해 아형 결정, 고병원성 유무, 계통도 분석을 통합적으로 수행할 수 있는 셸 스크립트와 파이선 기반의 분석 파이프라인을 개발하였음
- 개발하고자 하는 분석 파이프라인은 웹 기반으로 개발되어 있는 VirusTAP (Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline)을 기반으로 하여 조류인플루엔자에 보다 특화된 파이프라인임
- 개발된 분석 파이프라인의 개요는 아래 그림과 같음 (그림 42)

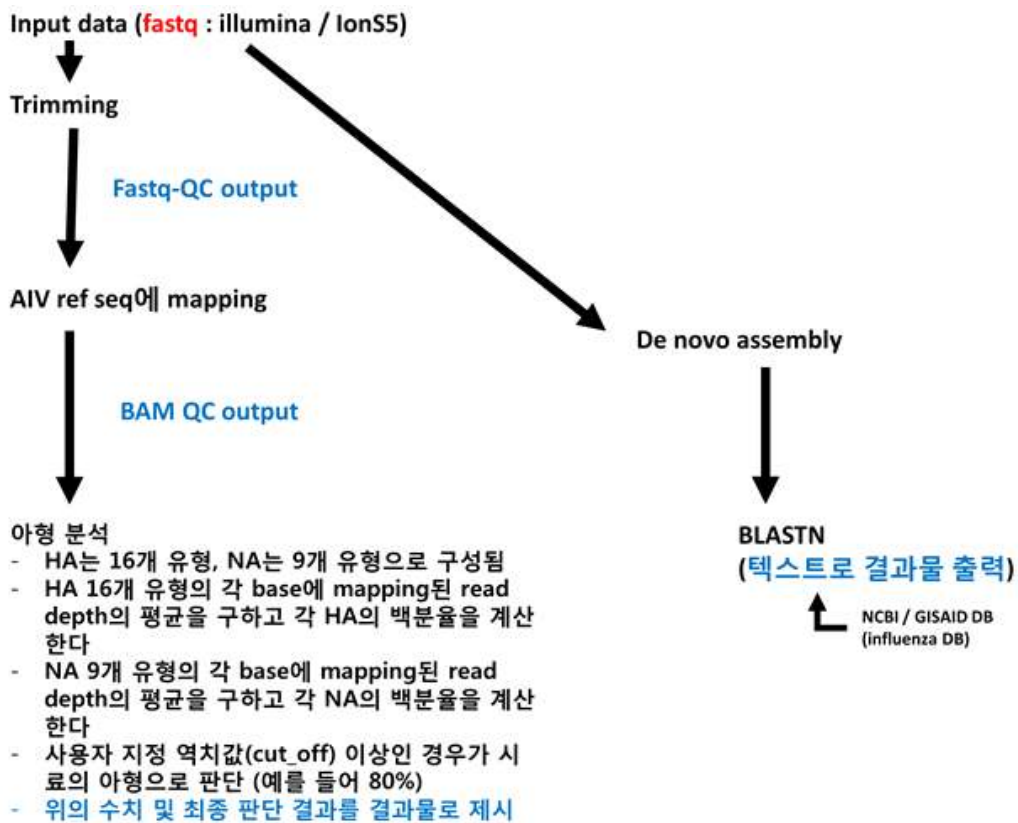


그림 42. NGS 데이터 분석 파이프라인 개요

- 분석 가능한 데이터는 Illumina 시퀀서에서 생산된 데이터 및 ThermoFisher 시퀀서에서 생산된 데이터 모두 분석 가능하도록 하였음
- 입력된 NGS 원자료(FASTQ)는 Trimmomatic 알고리즘을 이용하여 라이브러리 어댑터 및 저품질의 시퀀스 리드들을 제거하는 과정을 수행함
- 이후 trimming된 원자료 FASTQ 데이터는 FASTQC 알고리즘을 이용하여 데이터 질평가를 수행함. 수행 결과는 HTML 형식의 파일로 제공됨 (그림 43)

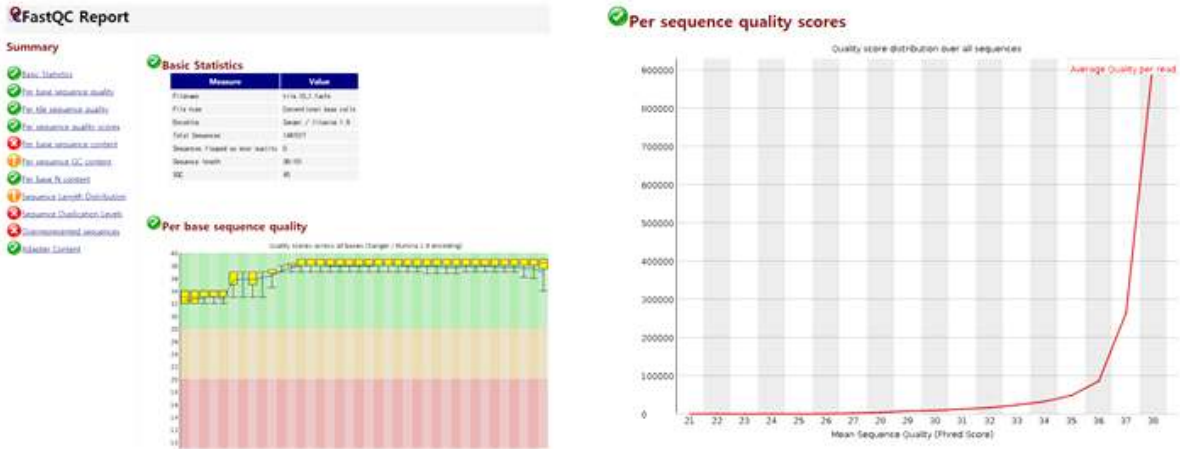


그림 43. NGS 데이터 QC 레포트 예제

- 데이터 QC 이후 FASTQ 파일을 기반으로 de novo assembly 및 reference sequence 기반의 remapping을 병렬로 수행함
- 이는 reference sequence 기반의 remapping은 아형 분석을 빠르게 수행하여 고병원성 유무를 신속히 레포트하기 위한 목적임
- Remapping을 위한 조류인플루엔자의 reference sequence 설정을 위해 NCBI의 Influenza Virus Resource 및 GISAID의 Influenza database에서 한국에서 보고된 조류인플루엔자 바이러스 염기서열 모두를 확보하였음
- 확보된 염기서열들은 염기서열 유사성 분석을 통해 consensus 염기서열로 변환하고, 이 consensus 염기서열을 BLAST하여 가장 유사성이 높은 바이러스 단편 염기서열을 표준 염기서열로 정했음
- 분석 대상 FASTQ파일의 시퀀스 리드들은 상기 표준 조류인플루엔자 바이러스 염기서열에 remapping 하였으며 이를 위해 BWA 알고리즘이 사용되었음
- Mapping이후 결과물은 BAM 파일 형식으로 출력되며, QUALIMAP 알고리즘을 이용하여 BAM 파일의 질평가를 수행함
- 질평가 결과는 “genome_results.txt“파일과 HTML형식의 파일로 제공됨. 아래 그림은 BAM파일의 질평가 결과 예제를 나타내고 있음 (그림 44)


```

1  BamQC report
2  -----
3
4  >>>>>>> Input
5
6  bam file = 10_out/10.bam
7  outfile = 10_out/genome_results.txt
8
9
10 >>>>>>> Reference
11
12  number of bases = 78,816 bp
13  number of contigs = 46
14
15
16 >>>>>>> Globals
17
18  number of windows = 444
19
20  number of reads = 2,884,232
21  number of mapped reads = 2,612,509 (90.58%)
22  number of supplementary alignments = 1,198 (0.84%)
23
24  number of mapped paired reads (first in pair) = 1,313,853
25  number of mapped paired reads (second in pair) = 1,298,656
26  number of mapped paired reads (both in pair) = 2,581,453
27  number of mapped paired reads (singletons) = 111,856
28
29  number of mapped bases = 382,351,115 bp
30  number of sequenced bases = 382,316,110 bp
31  number of aligned bases = 0 bp
32  number of duplicated reads (estimated) = 2,608,685
33  duplication rate = 86.51%
34
35
36 >>>>>>> Insert size
37
38  mean insert size = 317.5074
39  std insert size = 208.9277
40  median insert size = 294
41

```

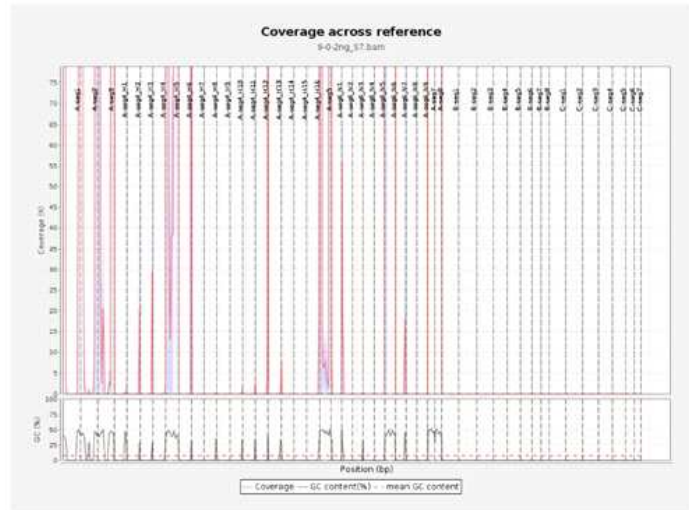


그림 44. BAM 파일의 질평가 결과 예제

- 분석 대상 검체의 아형 결정은 표준 조류인플루엔자 바이러스 염기서열에 80%이상 mapping된 경우를 결과로 제시하며, 판정기준치는 프로그램 구동 전 config 파일에서 변경할 수 있도록 하였음
- 이를 위해 앞선 결과물로 출력된 BAM파일의 질평가 분석결과를 이용하며 아래 그림 왼쪽은 분석검체의 mapping 결과를 나타내고 있음 (그림 38)
- 해당 그림에서 인플루엔자 B와 C에는 sequencing read들이 mapping되지 않은 반면 인플루엔자 A에만 특이적으로 mapping됨을 확인함. 또한 헤마글루티닌의 16개 아형 중 H5와 뉴라미니다이즈의 9개 아형중 N6에만 특이적으로 mapping됨을 확인함
- 해당 결과는 mapping rate 80%라는 판정기준치에 의해 아래 그림 오른쪽과 같이 H5N6로 아형이 제시됨 (그림 45)

ID	Length	Mapped bases	Mean coverage	SD
A-seg4_H1	1773	0	0	0
A-seg4_H2	1773	25	0.014100395	0.117904935
A-seg4_H3	1762	150	0.085180533	0.709602701
A-seg4_H4	1738	44	0.025516456	0.223588883
A-seg4_H5	1780	2761462	1551333146	1695396774
A-seg4_H6	1747	2066	1.162598741	9.613264514
A-seg4_H7	1732	0	0	0
A-seg4_H8	1744	0	0	0
A-seg4_H9	1742	42	0.024110218	0.218263908
A-seg4_H10	1728	0	0	0
A-seg4_H11	1760	42	0.023863636	0.217158467
A-seg4_H12	1737	25	0.014392631	0.119102826
A-seg4_H13	1768	0	0	0
A-seg4_H14	1748	0	0	0
A-seg4_H15	1763	0	0	0
A-seg4_H16	1760	0	0	0
A-seg6_N1	1463	0	0	0
A-seg6_N2	1467	481	0.327800017	2.420177793
A-seg6_N3	1453	0	0	0
A-seg6_N4	1463	0	0	0
A-seg6_N5	1470	0	0	0
A-seg6_N6	1465	19083754	1302645324	6950733515
A-seg6_N7	1462	203	0.138880889	1.162811016
A-seg6_N8	1461	0	0	0
A-seg6_N9	1460	0	0	0
B-seg1	2389	0	0	0
B-seg2	2396	0	0	0
B-seg3	2305	0	0	0
B-seg4	1882	0	0	0
B-seg5	1844	0	0	0
B-seg6	1557	0	0	0
B-seg7	1190	0	0	0
B-seg8	1097	0	0	0
C-seg1	2325	0	0	0
C-seg2	2285	0	0	0
C-seg3	2130	0	0	0
C-seg4	1968	0	0	0
C-seg5	1807	0	0	0
C-seg6	1125	0	0	0
C-seg7	935	0	0	0

Segment	Depth
A-seg4_H5	1494.557055
A-seg4_H6	74.88888889
A-seg6_N2	11.56521739
A-seg6_N6	6703.005638
A-seg6_N7	9

Subtype	Depth	Mapping Rate
H5	1494.557	0.952
N6	6703.006	0.997

그림 45. 분석 파이프라인 결과 예제

- Remapping 분석과 별도로 A5 알고리즘을 이용하여 de novo assembly를 수행하며 그 결과물을 BLAST하여 그 결과를 텍스트 형식으로 출력할 수 있도록 하였음
- BLAST 결과물은 추후 계통도 분석에 활용 가능하도록 하였음

나. 시퀀싱 장비에 연동 가능한 조류인플루엔자 바이러스 아형결정 시스템 개발

- ThermoFisher 시퀀싱 장비에서 아형 결정이 바로 될 수 있는 분석 파이프라인을 구축하였음
- 해당 파이프라인은 PathogenDetector 플러그인을 차용하였으며, 사용되는 표준 조류인플루엔자 바이러스 염기서열은 앞서 구축한 한국형 염기서열을 활용하였음
- 본 플러그인은 각 시료의 sequence read를 표준 조류인플루엔자 바이러스 염기서열에 mapping하고 그 결과를 바탕으로 아형을 제시하도록 설계하였음
- 출력 결과물로는 시퀀싱의 생산량 (coverage) 및 바이러스 각 단편의 mapping 결과를 테이블 형식으로 제시함. 또한 표준염기서열과 맞지 않는 단일염기서열 변이(mutation)의 숫자를 함께 표기하여 대략적인 진화정도를 파악할 수 있도록 하였음 (그림 46)

Matching segments, mean segment coverage and number of N's in consensus										
Barcode	Mean coverage	HA	MP	NA	NP	NS	PA	PB1	PB2	
IonXpress_052	433	H5Kor2016(H5N6) 271 8	Kor2016(H5N6) 474 8	N6Kor2016(H5N6) 505 1	Kor2016(H5N6) 202 10	Kor2016(H5N6) 1498 3	Kor2016(H5N6) 169 1	Kor2016(H3N2) 194 1	Kor2016(H5N6) 162 1	
IonXpress_053	217	H5Ref(H5N1) 140 61	Kor2016(H5N6) 243 15	N6Kor2016(H5N6) 259 2	Kor2016(H5N6) 134 21	Kor2016(H5N6) 671 9	Kor2016(H5N6) 82 1	Kor2016(H3N2) 114 1	Kor2016(H5N6) 95 1	
IonXpress_054	2739	H5Ref(H5N1) 744 63	Kor2016(H5N6) 6687	N6Kor2016(H5N6) 5093	Kor2016(H5N6) 2351 1	Kor2016(H5N6) 5732 1	Kor2016(H5N6) 480	Ref(H3N2) 310 214	Ref(H3N2) 516	
IonXpress_055	3096	H5Kor2016(H5N6) 2448 8	Kor2016(H5N6) 5040 8	N6Kor2016(H5N6) 4622	Kor2016(H5N6) 1801 5	Kor2016(H5N6) 6721	Kor2016(H5N6) 1157	Kor2016(H3N2) 1401	Kor2016(H5N6) 1583	
IonXpress_056	3429	H5Ref(H5N1) 2553 105	Kor2016(H5N6) 6366 8	N6Kor2016(H5N6) 4854	Kor2016(H5N6) 1544	Kor2016(H5N6) 6897	Ref(H3N2) 2034	Ref(H3N2) 1901	Kor2016(H5N6) 1285	
IonXpress_057	2888	H5Ref(H5N1) 2182 61	Kor2016(H5N6) 6302	N6Kor2016(H5N6) 3686	Kor2016(H5N6) 2470 8	Ref(H3N2) 4746 15	Kor2016(H5N6) 1615	Ref(H3N2) 771	Ref(H3N2) 1332	
IonXpress_058	2.1	Minimum coverage of 25 was not reached while generating the first-stage consensus genome								

그림 46. IonS5장비에서의 시퀀싱 결과 분석 예제

- 또한 각 단편에 mapping된 정도를 coverage plot으로 제시하여 시퀀싱의 질평가가 가능하도록 하였음. 아래 그림은 H5N6로 판정된 검체의 coverage plot을 나타내고 있음 (그림 47)

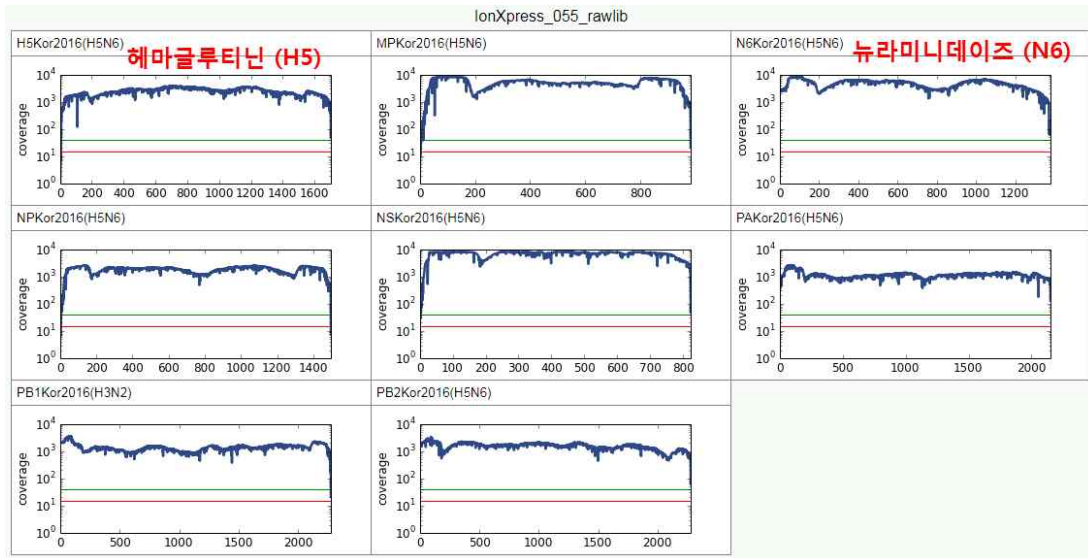


그림 47. IonS5장비에서의 시퀀싱 coverage plot 예제

제 4 절 조류인플루엔자 바이러스 분석 소프트웨어 개발

가. PAIVS 개발 개요

- 현재 시행중인 조류 인플루엔자 바이러스의 검사법으로는 간이진단키트와 PCR 기반의 유전자진단법이 사용되고 있으나, 조류 인플루엔자 바이러스의 특정 질편 (헤마글루티닌, 뉴라미니데이즈 등)의 특정 아형(H5, H7 등)만을 검사하여 고병원성 유무만을 판정하고 있음
- 따라서, 새로운 돌연변이나 유전자 재편성을 확인하기에는 한계가 있음
- 이는 조류인플루엔자 바이러스의 아형 결정에서부터, 고병원성 판단, 바이러스 유래 규명 및 유전자 재편성 유무의 평가가 동시에 이루어 질 수 있는 검사법이 개발된다면 기존 분석방법이 가지고 있던 한계점을 상당부분 해결하는 것이 가능함
- 이를 위해서는 일부 유전자 단편만이 아닌 전장 유전체 데이터의 분석이 필수적이며, 최근 차세대 염기서열 분석 (Next Generation Sequencing, NGS) 기술의 발전으로 조류 인플루엔자 바이러스의 전장 유전체 분석이 효율적으로 가능해졌음
- 국내에는 차세대 염기서열 분석 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 분석 표준이 확립되어 있지 않은 상황이고, 관련 데이터베이스 및 빅데이터를 활용한 조류 인플루엔자 바이러스 차세대 염기서열 분석 파이프라인은 개발되어야 할 영역으로 남아있음

- 본 연구팀은 차세대 염기서열 분석 기반의 조류 인플루엔자 바이러스의 전장유전체 데이터에서 아형 결정, 고병원성 유무, 바이러스 유래 및 계통도 분석을 통합적으로 수행할 수 있는 리눅스 운영체제 기반의 분석 파이프라인 PAIVS (Prediction of Avian Influenza Virus Subtype)를 개발하였음
- PAIVS는 분석 대상 검체의 full-length 염기서열과 가장 유사한 염기서열을 검색할 수 있는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]) 분석 도구를 지원하며 따라서 계통분석 등의 하위 분석에 활용 가능하도록 하였음

나. PAIVS 분석 파이프라인

- PAIVS는 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터를 분석할 수 있는 자동화된 분석 파이프라인이며 총 5단계로 구성되어 있음; 1) Data pre-processing 2) reference-guided alignment or de novo assembly 3) influenza virus subtyping 4) single nucleotide variant calling 5) identifying the closest sequences
- PAIVS는 python을 기반으로 작성되었으며 분석 흐름은 아래 그림과 같음 (그림 48)

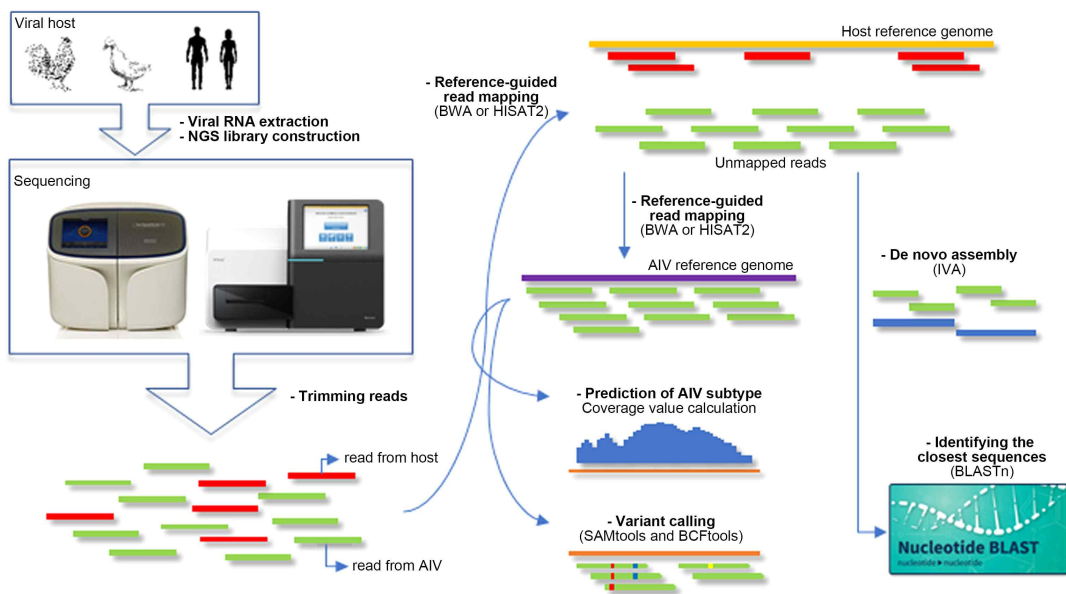


그림 48. PAIVS 분석 흐름도

- 우선 PAIVS는 paired-end viral genome sequencing에서 생산된 FASTQ파일을 input file format으로 받아들임
- Pre-processing 단계에서 PAIVS는 라이브러리 구축단계에서 생성되는 adaptor 염기서열 및 저품질의 low base quality 염기서열 시퀀싱 리드들을 제거하는 과정을 수행함

- 이후 trimming된 시퀀싱 리드들을 사람, 조류 등 숙주의 reference genome에 alignment를 수행하며, 이 과정을 통해 viral genome이 아닌 실험과정상 혼입될 수 있는 숙주의 염기서열 시퀀싱 리드들이 제거됨
- 앞의 단계에서 alignment되지 않은 unmapped 시퀀싱 리드들은 viral genome 유래 시퀀싱 리드로 간주하며, unmapped 시퀀싱 리드들을 대상으로 조류인플루엔자 바이러스의 reference genome에 alignment를 수행함
- 조류인플루엔자 바이러스의 referrece genome에 alignment된 시퀀싱 리드들의 품질 평가, 아형 결정, 돌연변이 검출을 수행함
- 부가적으로 de novo assembly 과정을 선택할 수 있도록 하였으며, 이는 BLAST 분석과 연계하여 분석 대상 검체와 가장 유사한 염기서열을 자동으로 추출할 수 있도록 하였음
- 각 단계별 산출물은 지정된 경로에 도출됨

다. NGS 데이터 전처리 과정

- Pre-processing 단계에서 PAIVS는 라이브러리 구축단계에서 생성되는 adaptor 염기서열 및 저품질의 low base quality 염기서열 시퀀싱 리드들을 제거하는 과정을 수행함
- 이 과정에는 TRIMMOMATIC 분석 도구를 사용하였음 (Bioinformatics. 2014; 30:2114-20)
- 실험과정상 혼입될 수 있는 숙주의 염기서열 시퀀싱 리드들의 제거는 숙주의 reference genome에 검체의 시퀀싱 리드들을 alignment함으로써 확인 및 제외하였음. 이 과정에는 HISAT2와 BWA aligner가 사용됨 (Nat Biotechnol. 2019; 37(8):907-915; Bioinformatics. 2009; 25:1754-60.)
- 이후 숙주의 reference genome에 mapping되지 않은 시퀀스 리드들은 SAMtools의 'view' 기능을 사용하여 추출하였음 (Bioinformatics. 2009; 25:2078-9)
- 앞의 단계에서 alignment되지 않은 unmapped 시퀀싱 리드들은 viral genome 유래 시퀀싱 리드로 간주하며, unmapped 시퀀싱 리드들을 대상으로 조류인플루엔자 바이러스의 reference genome에 alignment를 수행함
- 본 분석 프로그램에서 차용하고 있는 HISAT2와 BWA aligner들의 mapping rate, 메모리 사용량, 분석 시간등을 비교한 결과 BWA aligner의 'mem' 알고리즘이 HISAT2에 비해 우수한 성능을 나타냈음 (표 5 - 표 7)

ㄎ 5. Comparison of the mapping rate between HISAT2 and BWA aligner

Sample	Run time					
	HISAT2			BWA (MEM algorithm)		
	thread 2	thread 4	thread 8	thread 2	thread 4	thread 8
S1	0m34.720s	0m16.868s	0m17.834s	1m20.332s	0m42.727s	0m31.437s
S2	0m55.342s	0m13.532s	0m13.394s	1m35.105s	0m53.374s	0m36.142s
S3	0m48.453s	0m12.527s	0m13.232s	2m21.670s	1m17.922s	0m42.026s
S4	0m42.657s	0m13.654s	0m14.310s	1m26.063s	0m47.207s	0m28.993s
S5	0m40.107s	0m17.305s	0m14.020s	0m38.776s	0m23.869s	0m15.906s

ㄎ 6. Comparison of the memory usage between HISAT2 and BWA aligner

Sample	Memory usage (KB)	
	HISAT2	BWA (MEM algorithm)
S1	418,008	884
S2	411,920	888
S3	388,024	856
S4	266,668	856
S5	421,844	888

ㄎ 7. Comparison of the mapping rates(%) between HISAT2 and BWA aligner

Sample	Memory usage (KB)	
	HISAT2	BWA (MEM algorithm)
S1	0.19	88.87
S2	0.26	93.23
S3	0.23	94.62
S4	0.16	89.66
S5	0.15	90.34

- 위 표에서 HISAT2는 더 빠르고 더 적은 메모리를 사용한다는 측면에서 BWA에 비해 우수하였음
- 하지만 HISAT2는 조류인플루엔자 바이러스의 reference genome에 alignment를 수행한 결과 평균 mapping rate가 0.2%에 불과한 반면 BWA의 'mem' 알고리즘은 91.3%로 확인되었음
- 따라서 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 분석에는 HISAT2 aligner에 비해 BWA 'mem' 알고리즘이 적절할 것으로 판단됨

라. 조류인플루엔자 바이러스의 아형 결정

- NGS기반 조류인플루엔자 바이러스 아형 분석을 위해 PAIVS는 헤마글루티닌 유전자의 18가지 아형 (H1-18)과 뉴라미니데이즈 유전자의 11가지 아형 (N1-11)에 대해 시퀀싱 리드 coverage 분석을 수행함
- 본 분석에는 SAMtools 분석 도구를 사용하였음
- 각 아형에 대해 coverage value를 산출하게 되며 coverage value는 각 아형의 시퀀싱 리드 coverage 합을 각 아형의 염기서열 길이로 보정하는 과정을 통해 도출됨
- coverage value를 산출하기 위한 수식은 다음과 같음 (그림 49)

$$\text{Segment Mean Coverage}_s = \frac{\sum_{k=1}^p D_p}{p}$$

그림 49. Coverage value 산출식

- 위 수식에서 D_p 는 각 genomic position의 시퀀싱 depth를 의미하며 p 는 rkr 아형의 염기서열 길이, k 는 각 genomic position을 의미함
- 위 수식을 통해 산출된 coverage value는 리눅스 터미널 콘솔상에 표시되며 결과물은 콤마로 분리된 텍스트 파일 양식으로 저장됨 (그림 50)

```

=====
tag                depth
0      A-seg4_H1    0.000000
1      A-seg4_H10   0.000000
2      A-seg4_H11   0.000000
3      A-seg4_H12   0.000000
4      A-seg4_H13   0.000000
5      A-seg4_H14   0.000000
6      A-seg4_H15   0.000000
7      A-seg4_H16   0.000000
8      A-seg4_H2    0.000000
9      A-seg4_H3    0.000000
10     A-seg4_H4    0.000000
11     A-seg4_H5    1494.758853
12     A-seg4_H6    1.158076
13     A-seg4_H7    0.000000
14     A-seg4_H8    0.000000
15     A-seg4_H9    0.000000
16     A-seg6_N1    0.000000
17     A-seg6_N2    0.181446
18     A-seg6_N3    0.000000
19     A-seg6_N4    0.000000
20     A-seg6_N5    0.000000
21     A-seg6_N6    6496.791667
22     A-seg6_N7    0.135524
23     A-seg6_N8    0.000000
24     A-seg6_N9    0.000000
=====
=====
H5      1494.759    0.999
N6      6496.792    1.0
=====
=====
real    0m0.443s
user    0m0.390s
sys     0m0.054s
=====

```

그림 50. Coverage value 표시화면 예

- 또한 헤마글루티닌과 뉴라미니테이즈 유전자의 각 아형에 대한 coverage depth는 png 파일 형식의 그림파일로 저장됨
- 아래 그림은 H5로 확인된 검체의 헤마글루티닌 유전자 각 아형 coverage depth를 나타내고 있음 (그림 51)

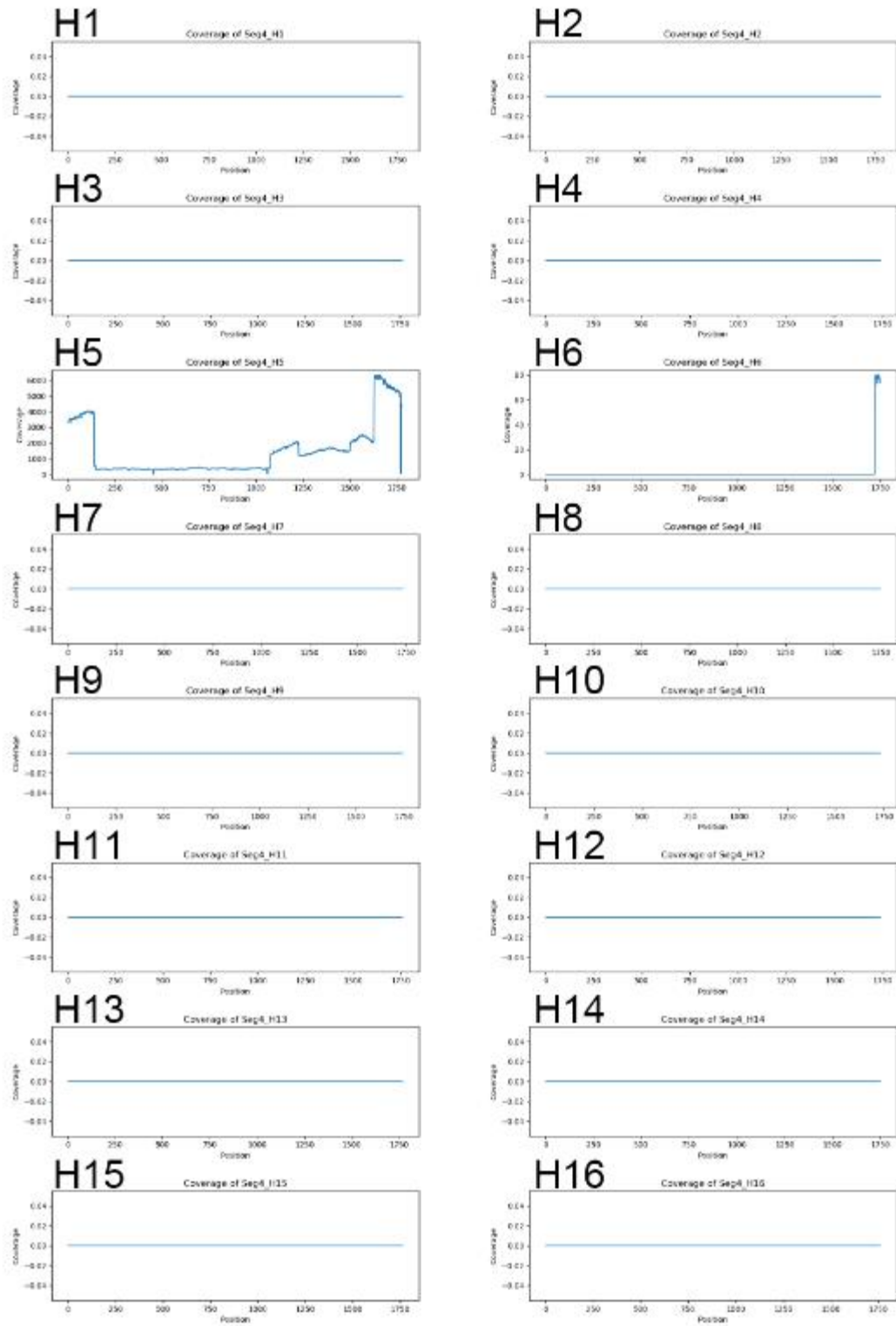


그림 51. 헤마글루티닌 유전자 각 아형의 coverage depth 예제

- 아래 그림은 N6로 확인된 검체의 뉴라미니테이즈 유전자 각 아형 coverage depth를 나타내고 있음 (그림 52)

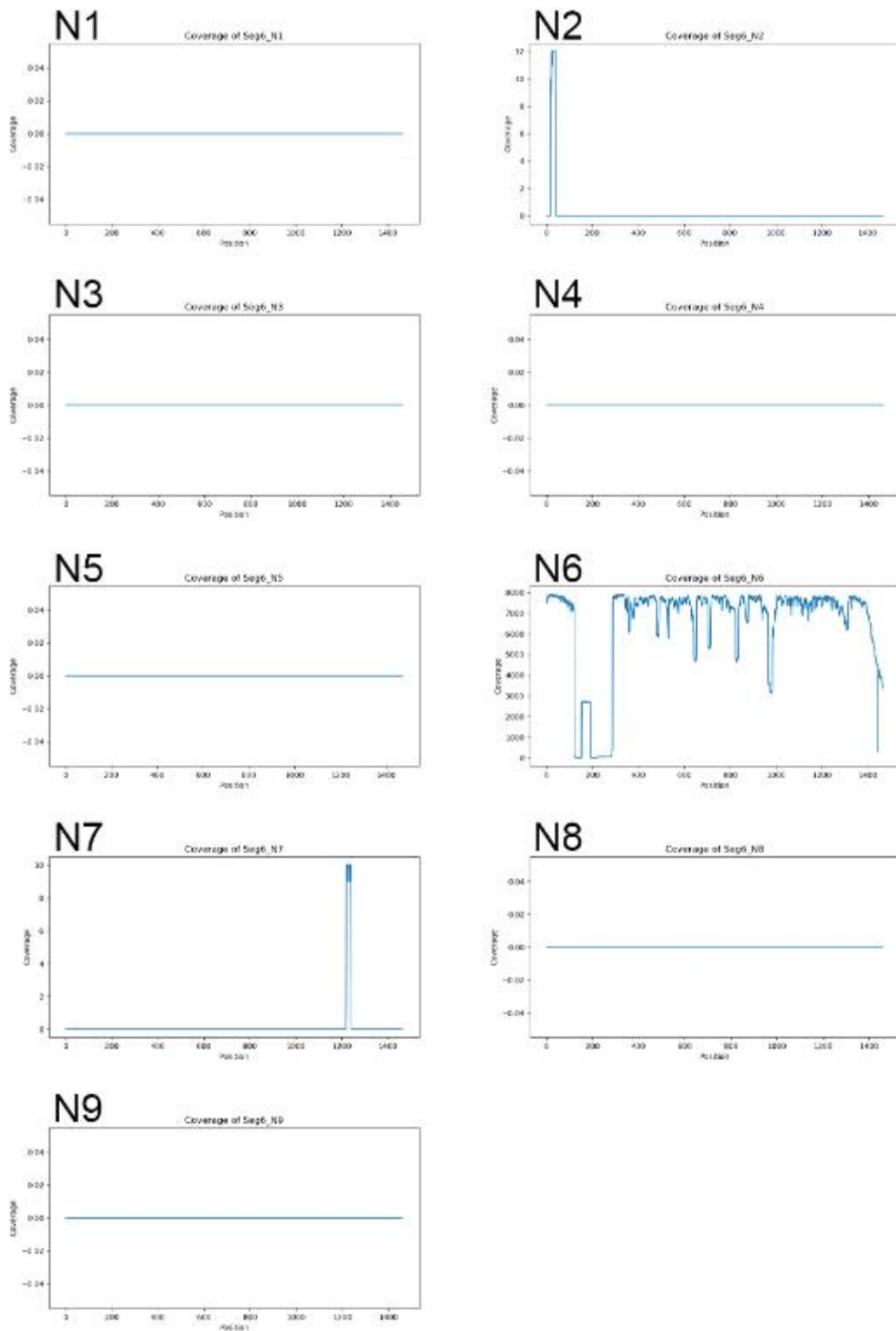


그림 52. 뉴라미니데이즈 유전자 각 아형의 coverage depth 예제

마. 돌연변이 검출 및 de novo assembly

- PAIVS는 돌연변이 검출을 위해 SAMtools와 VCF tools (Bioinformatics. 2017; 33:2037-9)를 차용하였음

- 이 분석 도구들은 Varscan이나 Haplotypecaller등에 비해 빠르고 메모리 사용량이 적다는 장점이 있음
- 돌연변이 검출 결과물은 variant call format (VCF)형태의 텍스트파일로 저장되며 아래 그림은 돌연변이 검출 결과를 나타내고 있음 (그림 53)

#CHROM	POS	REF	ALT	QUAL	INFO	FORMAT	sample.bam
A-seg1	4	A	G	87	DP=1157;VDB=0;SGB=-0.693147;RPB=1.87555e-08;MQB=0.000464813;BQB=0;MQOF=0;ICB=1;HOB=0.5;AC=1;AN=2;DP4=651,0,492,0;MQ=56	GT:PL	0/1:120,0,215
A-seg1	17	T	A	225	DP=1282;VDB=0;SGB=-0.693147;MQOF=0;AC=2;AN=2;DP4=0,0,1259,0;MQ=56	GT:PL	1/1:255,255,0
A-seg1	27	T	C	228	DP=1285;VDB=0;SGB=-0.693147;RPB=1;MQB=1;BQB=1;MQOF=0;AC=2;AN=2;DP4=1,0,1265,0;MQ=56	GT:PL	1/1:255,255,0
A-seg1	31	G	A	228	DP=1287;VDB=0;SGB=-0.693147;RPB=0,115917;MQB=0.94878;BQB=0.696528;MQOF=0;AC=2;AN=2;DP4=5,0,1263,0;MQ=56	GT:PL	1/1:255,255,0
A-seg1	33	A	C	228	DP=1287;VDB=0;SGB=-0.693147;RPB=0;MQB=0.916272;BQB=0.0675355;MQOF=0;AC=2;AN=2;DP4=2,0,1266,0;MQ=56	GT:PL	1/1:255,255,0
A-seg1	49	C	A	225	DP=1227;VDB=0;SGB=-0.693147;MQOF=0;AC=2;AN=2;DP4=0,0,1209,0;MQ=59	GT:PL	1/1:255,255,0

그림 53. 돌연변이 검출 예제

- De novo assembly는 바이러스 genome의 assemble에 특화된 Iterative Virus Assembler (IVA)를 차용하였음 (Bioinformatics. 2015; 31:2374-6)
- IVA의 산출물인 FASTA파일이 생성되면 연이러 BLAST 분석 도구를 사용하여 분석 검체와 가장 유사한 염기서열을 도출하게 되며 그 예는 아래 그림과 같음 (그림 54)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
EPI_ISL_162467 A/duck/Guangdong/GD01/2014 NA	2438	0
EPI_ISL_179634 A/duck/Jiangxi/NCDZT1123/2014 NA	2405	0
EPI_ISL_179635 A/duck/Jiangxi/NCDZT1126/2014 NA	2405	0
EPI_ISL_205115 A/duck/Wuhan/WHYF02/2015 NA	2338	0
EPI_ISL_205116 A/duck/Wuhan/WHYF03/2015 NA	2338	0
EPI_ISL_205142 A/turtledove/Wuhan/HKBJ07/2015 NA	2337	0
EPI_ISL_205117 A/chicken/Wuhan/WHYJ01/2015 NA	2337	0
EPI_ISL_205118 A/chicken/Wuhan/WHYJ02/2015 NA	2337	0

그림 54. De novo assembly 및 BLAST 분석 예제

바. 분석 결과의 quality control

- PAIVS의 모든 분석 결과들은 BAM file, text file, image파일 형식으로 저장됨
- 시퀀스 리드들의 trimming 결과물은 FastQC 알고리즘을 사용하여 질평가를 수행하고 시퀀스 리드 alignment 결과는 Qualimap 알고리즘을 사용하여 질평가를 수행함
- 아래 그림은 FastQC/Qualimap 분석 결과를 나타내고 있음 (그림 55 - 그림 56)

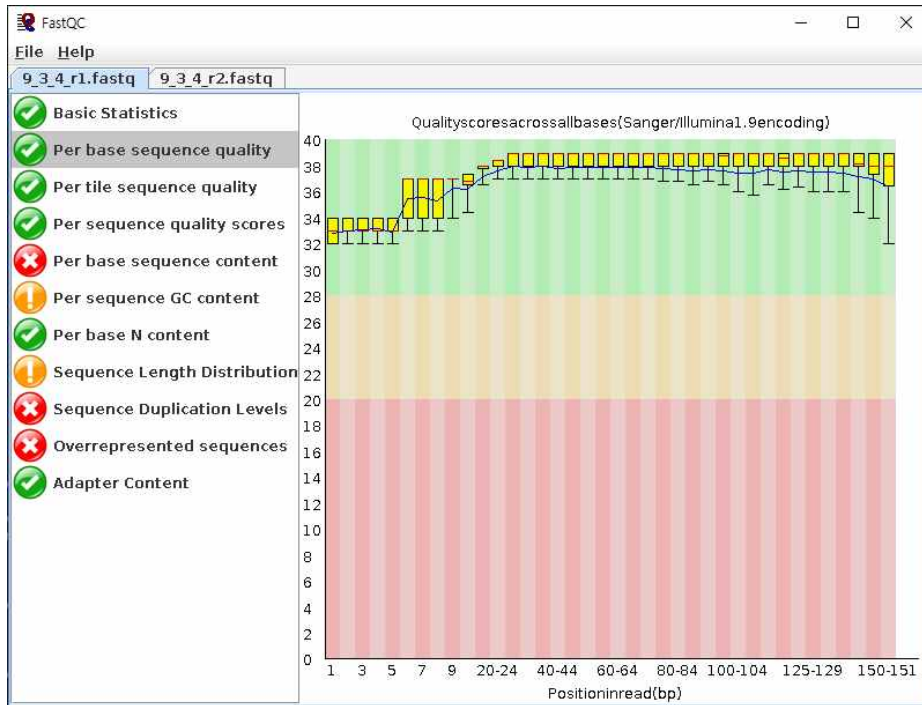


그림 55. FastQC를 통한 trimmed read의 quality check

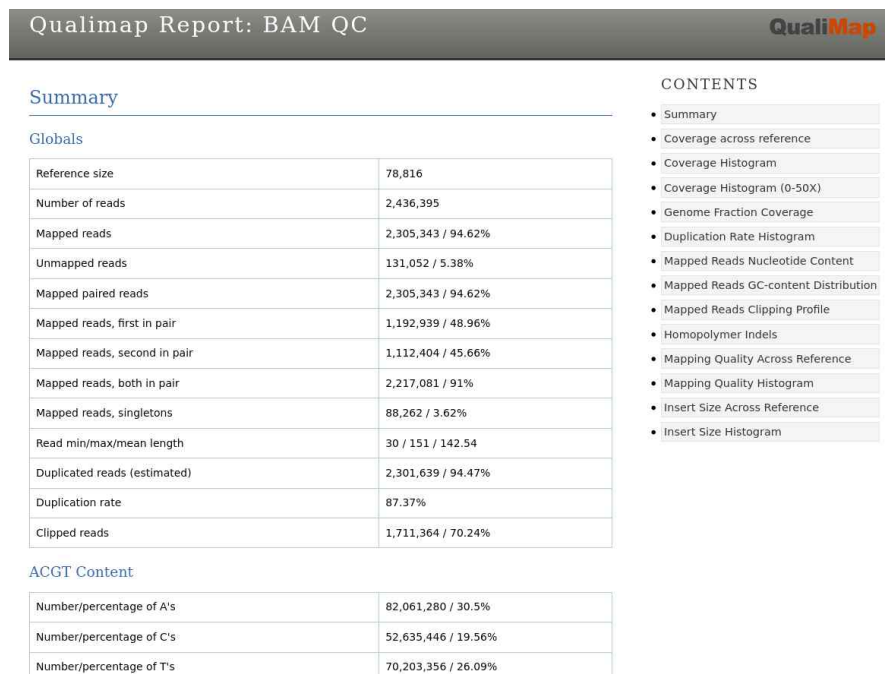


그림 56. Qualimap을 통한 processed BAM file의 Quality check

- PAIVS 분석 프로그램은 본 연구팀 홈페이지 (<http://ircgp.com/paivs>)를 통해 분석 스크립트를 제공하고 있으며 분석에 필요한 리눅스 기반의 소프트웨어 설치와 숙주 reference genome 설정을 통해 간편하게 조류인플루엔자 바이러스의 분석이 가능함
- 특히 본 프로그램은 사용자 친화적으로 개발하여 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 분석에 익숙치 않은 사용자도 간편하게 사용할 수 있음

제 5 절 조류인플루엔자 바이러스 유전자 진화 특성 분석

가. 분석 개요

- NGS로 생산된 조류인플루엔자 바이러스 염기서열 정보를 바탕으로 유전자 진화 특성을 분석하였음
- 분석 대상은 2017년 12월에서 2019년 8월까지 수집된 조류인플루엔자 바이러스 중, H5N6를 대상으로 하였음
- 고병원성 조류인플루엔자 바이러스는 가금류와 인간에게 심각한 호흡기 질환과 사망을 일으키기에 사회경제적으로 심각한 위협이 되고 있음
- 중국 광둥지방에서 고병원성 H5N1 조류인플루엔자 바이러스가 처음으로 검출된 이래 H5 hemagglutinine (HA) 유전자는 10개의 유전적으로 구분되는 clade (clades0-9)로 진화해 오고 있음 (Emerg Infect Dis. 2008; 14(7):e1)
- 전세계적으로 H5 clade 2.3.4.4의 새로운 재조합 (reassortant) 고병원성 조류인플루엔자 바이러스가 검출되고 있음 (Cell Host Microbe. 2016; 20(6):810-821)
- 중국, 라오스, 베트남에서 2014년 처음 검출된 clade 2.3.4.4 H5N6 바이러스는 전세계로 급속히 퍼져나가 조류독감 발병을 유발하였으며 23건의 실험실적으로 확인된 인체감염 사례가 보고되어 있음 (Emerg Infect Dis. 2017; 23(5):822-826., Emerg Microbes Infect. 2018; 7(1):103., <https://iris.wpro.who.int/>)
- 한국에서는 2014년에서 2018년의 기간동안 대규모의 조류인플루엔자가 가금류에서 발병하였음
- 특히, 2016-2017과 2017-2018 겨울 기간 동안의 발병은 새로운 재조합 고병원성 H5N6 (clade 2.3.4.4) 바이러스에 의해 야기되었으며, 이로 인해 440여개 농장에서 약 10억 마리의 가금류가 희생되었음 (<https://www.kahis.go.kr/>)
- 본 분석에서는 2017년 12월부터 2019년 8월까지 한국의 야생 조류와 오리에서 분리된 고병원성 H5N6 아형 조류인플루엔자 바이러스의 진화 및 분자 특성을 조사하였음

나. 분석 방법

- 분석 대상 검체는 총 12주로 모두 H5N6로 확인된 검체이며, 2017년 12월부터 2019년 8월까지 충청북도 음성 (n=10) 또는 충주 (n=2)에서 야생조류의 배설물 또는 사체에서 수집된 시료임
- 충청북도 음성 및 충주는 조류인플루엔자 바이러스가 발병한 적 있는 많은 가금류 농장 뿐 아니라 겨울철 야생 오리와 철새의 서식지 역할을 하는 여러 강과 저수지가 위치하고 있음 (그림 57)

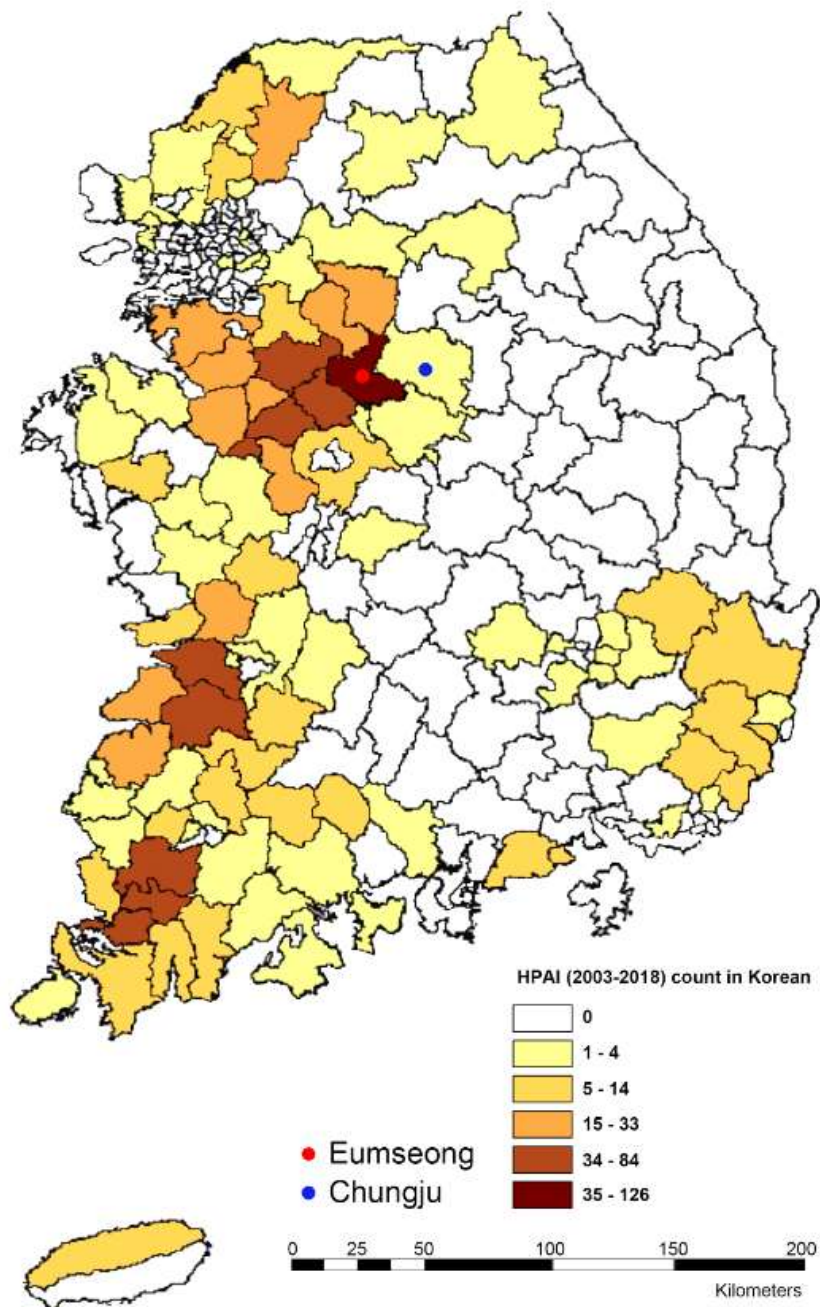


그림 57. 2003-2018년 고병원성 조류인플루엔자 발생현황
(참고: 국립환경과학원 발간등록번호 11-1480523-003431-01)

- NGS 데이터 생산은 Thermo Fisher 사의 IonS5 시퀀서를 이용하였으며 상세 내용은 제 2 절에 기술되어 있음
- NGS 데이터의 pre-processing은 Torrent Suite v5.6.0을 이용하였으며 Pathogen Detector 플러그인 v1.4를 사용하였음
- H5 아형의 clade 분류 및 분자 특성 분석은 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Influenza Research Database (IRD)의 분석 도구를 이용하였음
- 계통분석 (phylogeny analysis)를 위해 인플루엔자 바이러스 염기서열 정보를 National Center for Biotechnology Information (NCBI)와 EpiFlu database of the Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)에서 수집하였음 (그림 58)

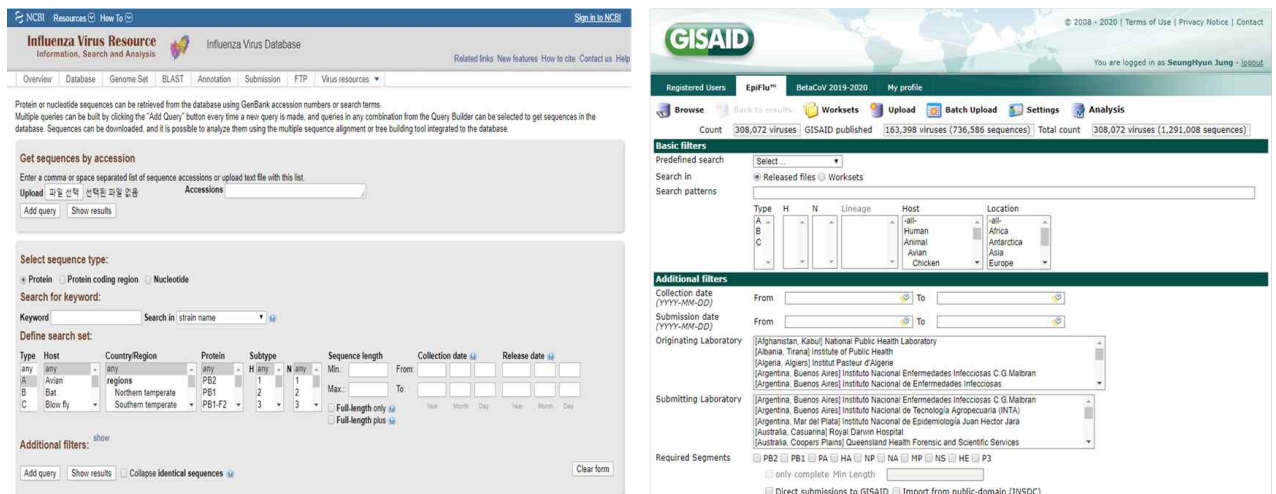


그림 58. NCBI와 GISAID 인플루엔자 바이러스 데이터베이스

- 수집된 인플루엔자 바이러스 염기서열 정보들은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]) 분석 도구를 사용하여 본 분석 대상인 12종의 조류인플루엔자 바이러스와 가장 유사한 전장 염기서열을 확보하였음
- 해당 염기서열들은 본 분석대상인 12종의 바이러스 염기서열과 함께 multiple alignment 과정을 수행하였으며 이 과정에는 ClustalW 알고리즘이 사용되었음
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10 (MEGAX) 프로그램을 이용하여 계통분석을 수행하였으며, 이 과정에는 Tamura-Nei model을 기반으로 하는 maximum likelihood (ML) 방법이 사용되었음
- 모든 계통분석은 1000번의 bootstrap replicate 과정을 수행하였음

다. 분석 결과 1- H5N6의 유전적/진화적 특성

- 본 연구에 사용된 12종의 조류인플루엔자 바이러스 염기서열 유전체 정보는 NCBI의 GenBank에서 확인 가능함 (표 8)

표 8. GenBank accession numbers for 12 H5N6 subtype viruses

	A/An as platy rhyn chos/ Sout h Kore a/170 2/201 7	A/An as platy rhyn chos/ Sout h Kore a/170 3/201 7	A/Wi ld Anas platy rhyn chos) /Sout h Kore a/170 5/201 7	A/An as platy rhyn chos/ Sout h Kore a/170 9/201 7	A/wi ld Anas platy rhyn chos) /Sout h Kore a/171 0/201 7	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/180 1/201 8	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/180 4/201 8	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/190 8/201 9	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/191 4/201 9	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/191 5/201 9	A/wi ld duck/ Sout h Kore a/192 0/201 9
PB2	MN5 65983	MN5 66008	MN5 66016	MN5 66025	MN5 66033	MN5 66050	MN8 09349	MN5 66059	MN5 77311	MN5 77320	MN5 77331
PB1	MN5 65984	MN5 66009	MN5 66017	MN5 66026	MN5 66034	MN5 66051	MN8 09350	MN5 66060	MN5 77312	MN5 77321	MN5 77332
PA	MN5 65985	MN5 66010	MN5 66018	MN5 66027	MN5 66035	MN5 66052	MN8 09351	MN5 66061	MN5 77313	MN5 77322	MN5 77333
HA	MN5 65986	MN5 66011	MN5 66019	MN5 66028	MN5 66036	MN5 66053	MN8 09352	MN5 77280	MN5 77314	MN5 77323	MN5 77334
NP	MN5 65987	MN5 66012	MN5 66020	MN5 66029	MN5 66037	MN5 66054	MN8 09353	MN5 66062	MN5 77315	MN5 77324	MN5 77335
NA	MN5 65988	MN5 66013	MN5 66021	MN5 66030	MN5 66038	MN5 66055	MN8 09354	MN5 66063	MN5 77316	MN5 77325	MN5 77336
MP	MN5 65989	MN5 66014	MN5 66022	MN5 66031	MN5 66039	MN5 66056	MN8 09355	MN5 66064	MN5 77317	MN5 77326	MN5 77337
NS	MN5 65990	MN5 66015	MN5 66023	MN5 66032	MN5 66033	MN5 66057	MN8 09356	MN5 66065	MN5 77318	MN5 77327	MN5 77338

- Full-length 염기서열 정보를 비교한 결과 분석 대상인 12종의 조류인플루엔자 바이러스간 염기서열 유사도가 98.32%에서 100%로 확인되었음
- 분석 대상인 H5N6 조류인플루엔자 바이러스 12종의 기원을 규명하기 위해 계통 분석을 수행하였음
- 분석 결과 2017년에 분리된 5개 검체와 2019년에 분리된 5개 검체는 2016년 한국에서 보고된 A/environment/Korea/W544/2016 (H5N6)와 함께 cluster를 형성하였음
- A/environment/Korea/W544/2016 (H5N6)는 2016년 한국에서 고병원성 H5N6발병을 야기하였으며, 해당 바이러스주와 2017년 및 2019년 분석대상 검체와 함께 cluster를 형성하였다는 점은 2017년과 2019년 한국에서 분리된 조류인플루엔자 바이러스가 clade 2.3.4.4의 고병원성 H5N6 Group C에 속함을 의미함
- 대조적으로, 2018년에 분리된 2개 검체는 2017년 일본에서 보고된 A/tufted duck/Shimane/3211TY001/2017 (H5N6)와 함께 cluster를 형성하였음
- 해당 바이러스주가 2018년 분석대상 검체와 함께 cluster를 형성하였다는 점은 2018년 한국에서 분리된 조류인플루엔자 바이러스가 clade 2.3.4.4의 고병원성 H5 Group D에 속함을 의미함
- 아래 그림은 헤마글루티닌 유전자의 계통분석 결과를 나타내고 있으며 빨간색 화살표는 2017년과 2019년에 분리된 검체를, 파란색 화살표는 2018년에 분리된 검체를 나타냄 (그림 59)
- 그림 52에서 group C는 2015년에서 2018년 동안 일본, 중국, 한국 등에서 검출된 H5N6 조류인플루엔자 바이러스를 포함하고 있으며, 특히 중국의 광둥, 유난, 장수지역에서 인체감염이 보고된 바 있음
- 그림 52에서 group D는 2016년에서 2018년 동안 일본, 유럽, 한국 등에서 검출된 H5N6 와 H5N8 조류인플루엔자 바이러스를 포함하고 있음
- 헤마글루티닌 유전자와 유사하게, 2017년과 2019년에 분리된 조류인플루엔자 H5N6 바이러스는 나머지 7개 유전자 (PB2, PB1, PA, NP, NA, MP, NS) 모두에서 2018년에 분리된 조류인플루엔자 H5N6 바이러스와 진화적으로 구분되는 양상을 나타냈음

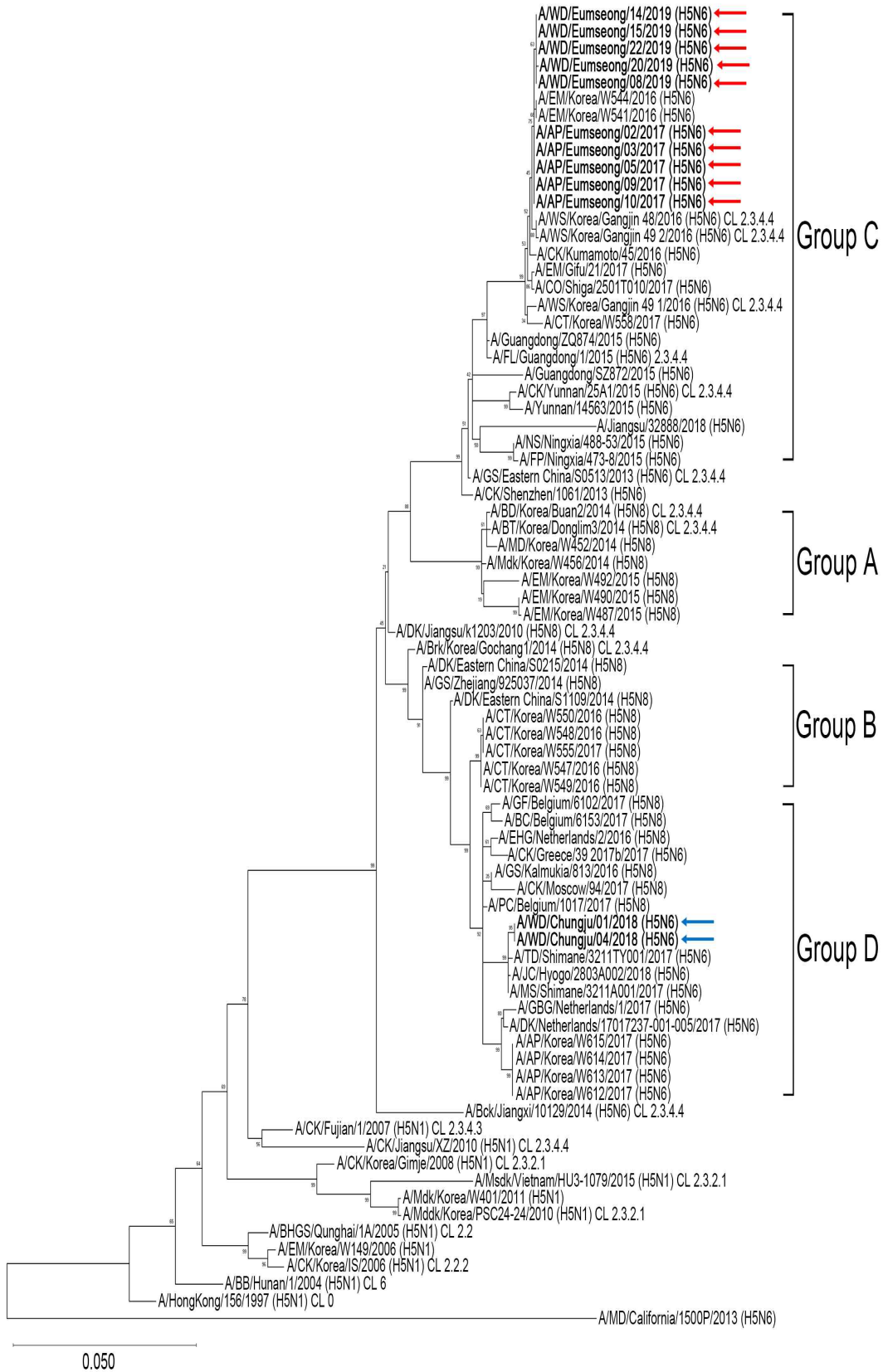


그림 59. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 유전자 계통분석 결과

- 아래 그림은 헤마글루티닌 이외의 7개 유전자 계통분석 결과를 나타내고 있으며 빨간색 화살표는 2017년과 2019년에 분리된 검체를, 파란색 화살표는 2018년에 분리된 검체를 나타냄 (그림 60 - 그림 66)

A

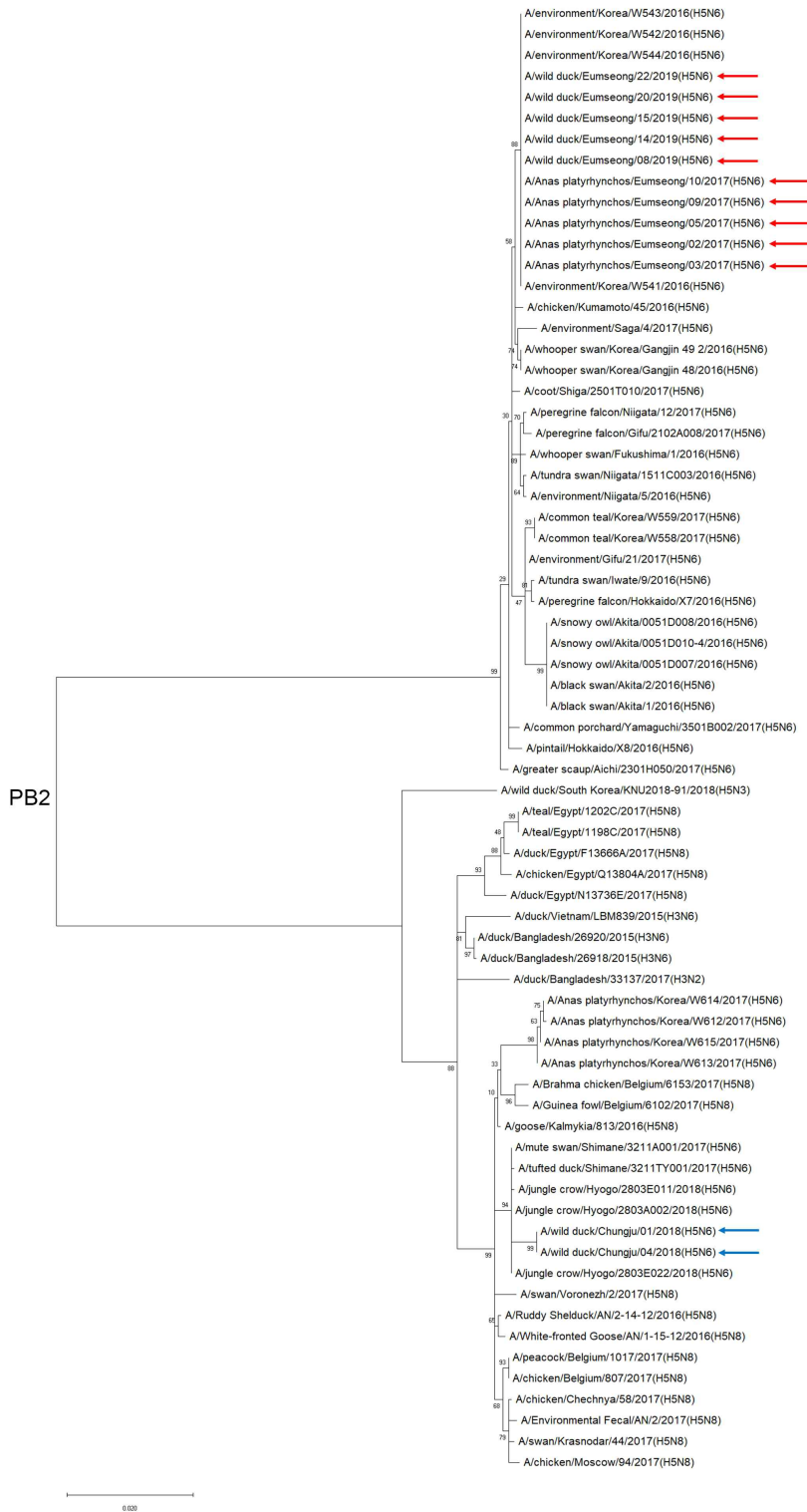


그림 60. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 PB2 유전자 계통분석 결과

B

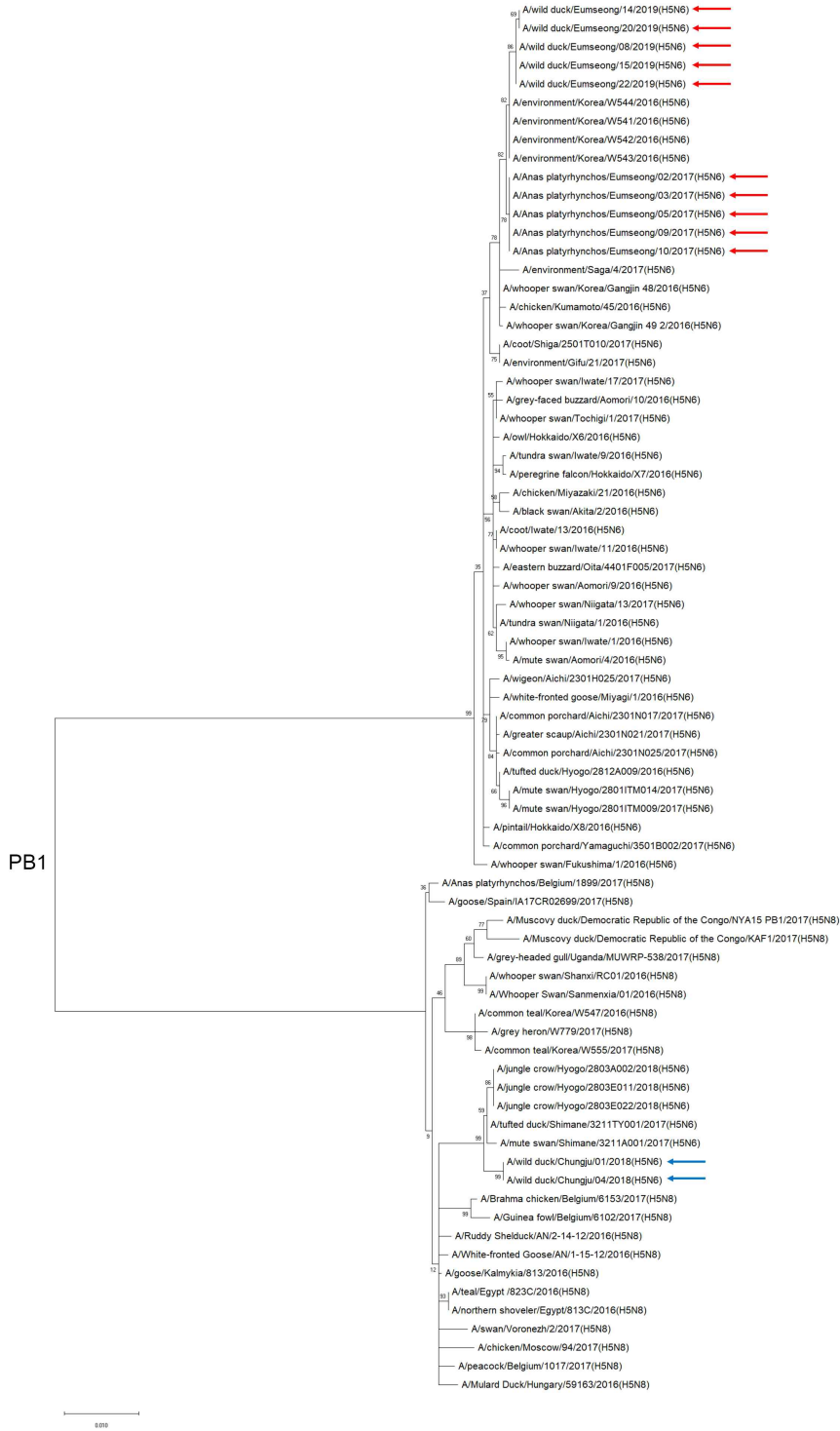


그림 61. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 PB1 유전자 계통분석 결과

C

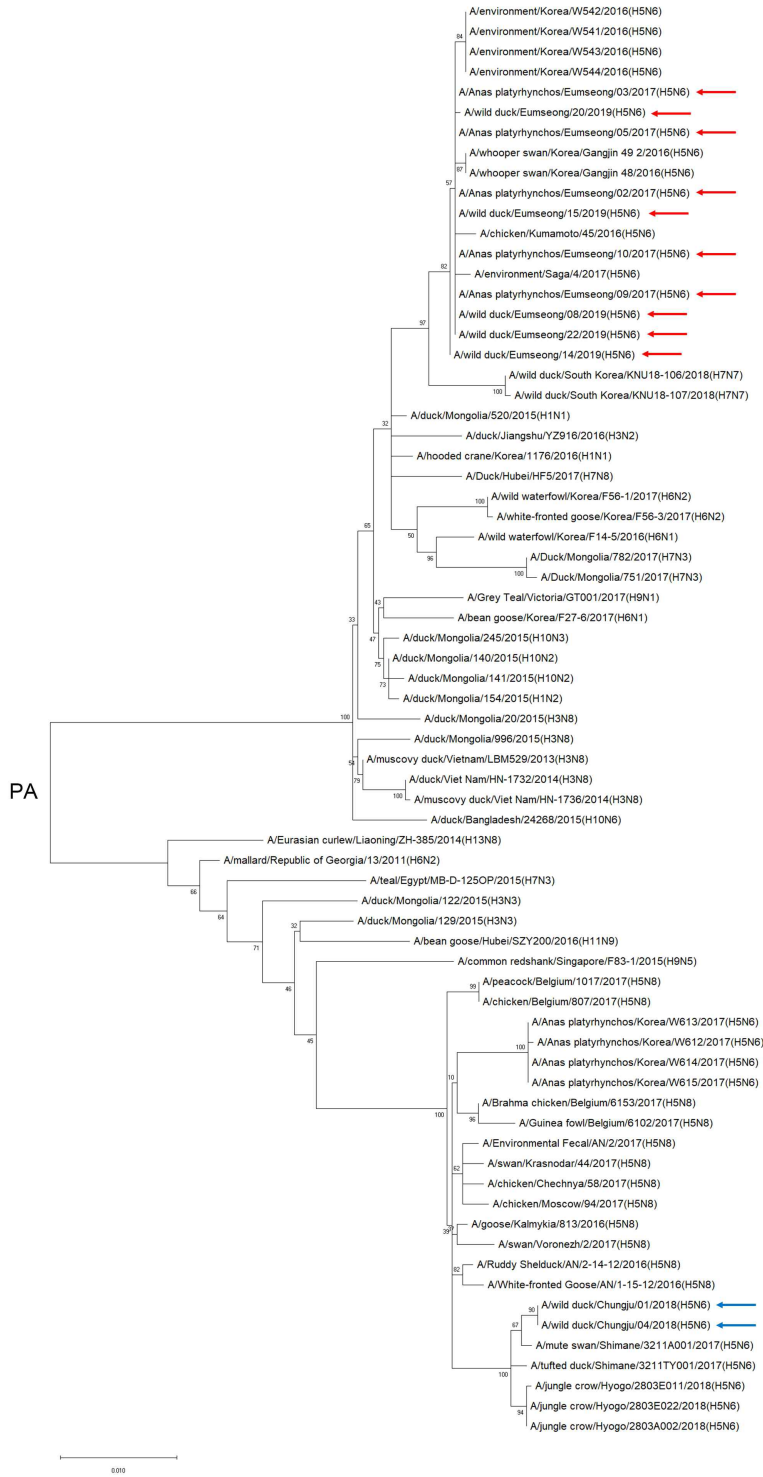


그림 62. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 PA 유전자 계통분석 결과

D

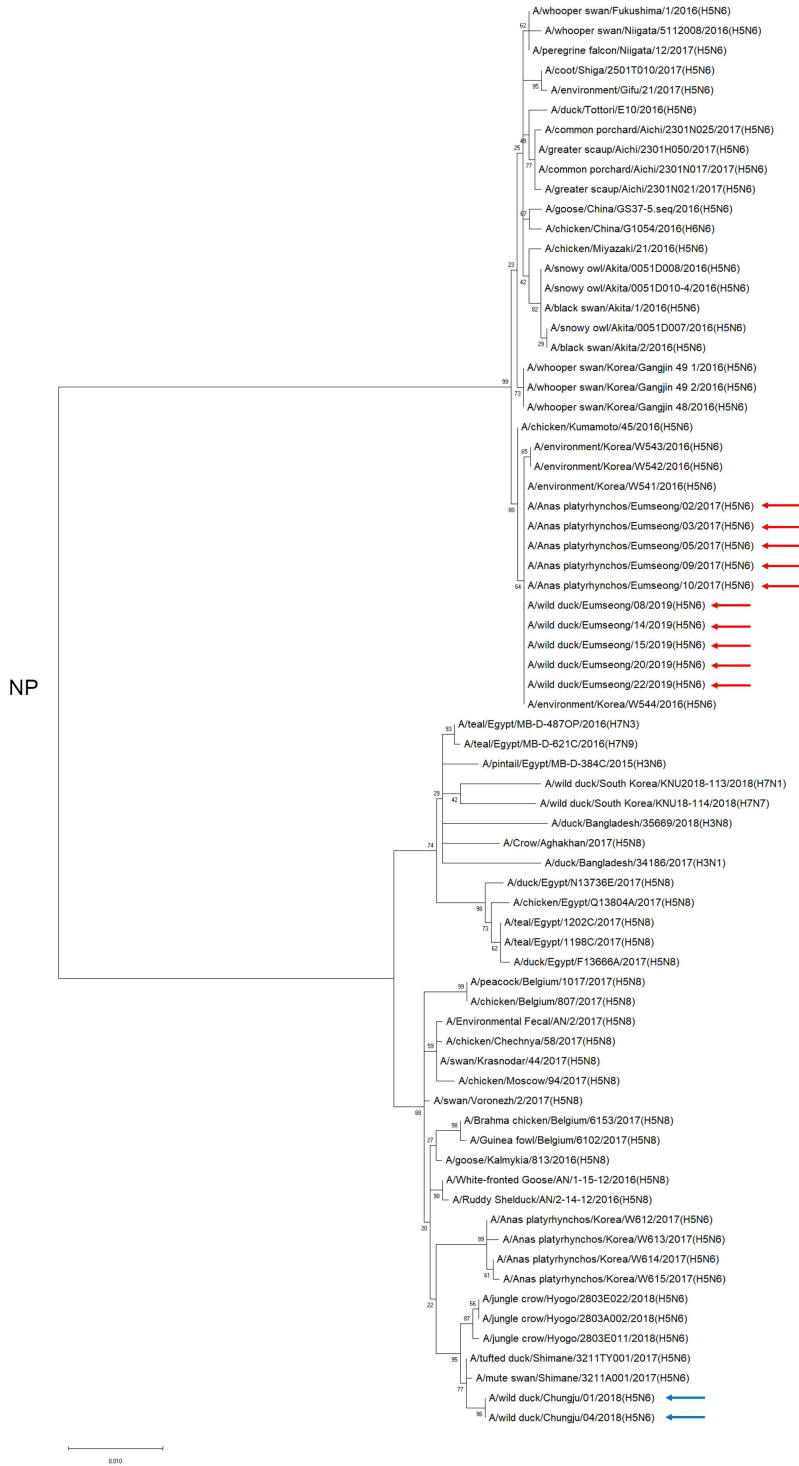


그림 63. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 NP 유전자 계통분석 결과

E

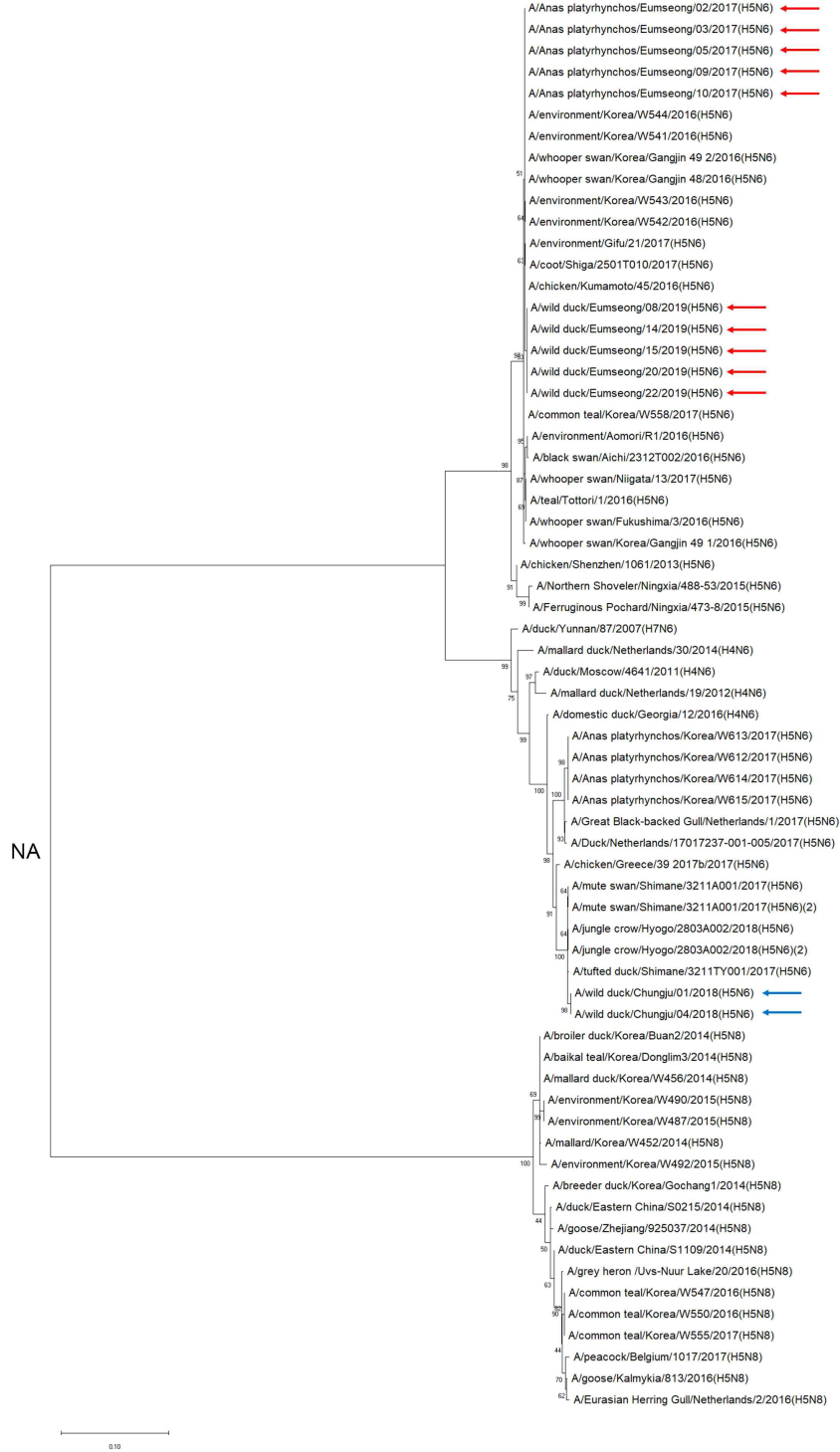


그림 64. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 NA 유전자 계통분석 결과

F

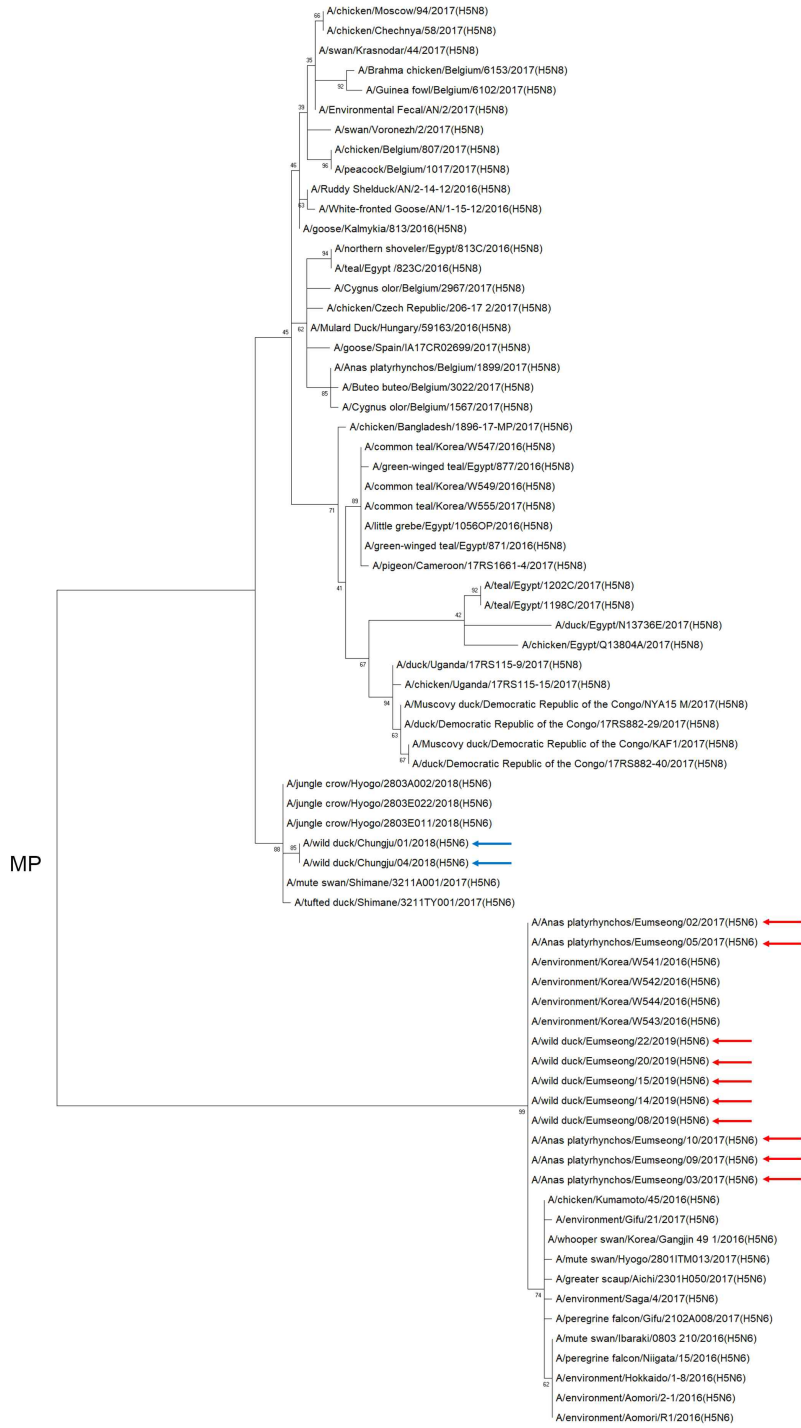


그림 65. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 MP 유전자 계통분석 결과

G

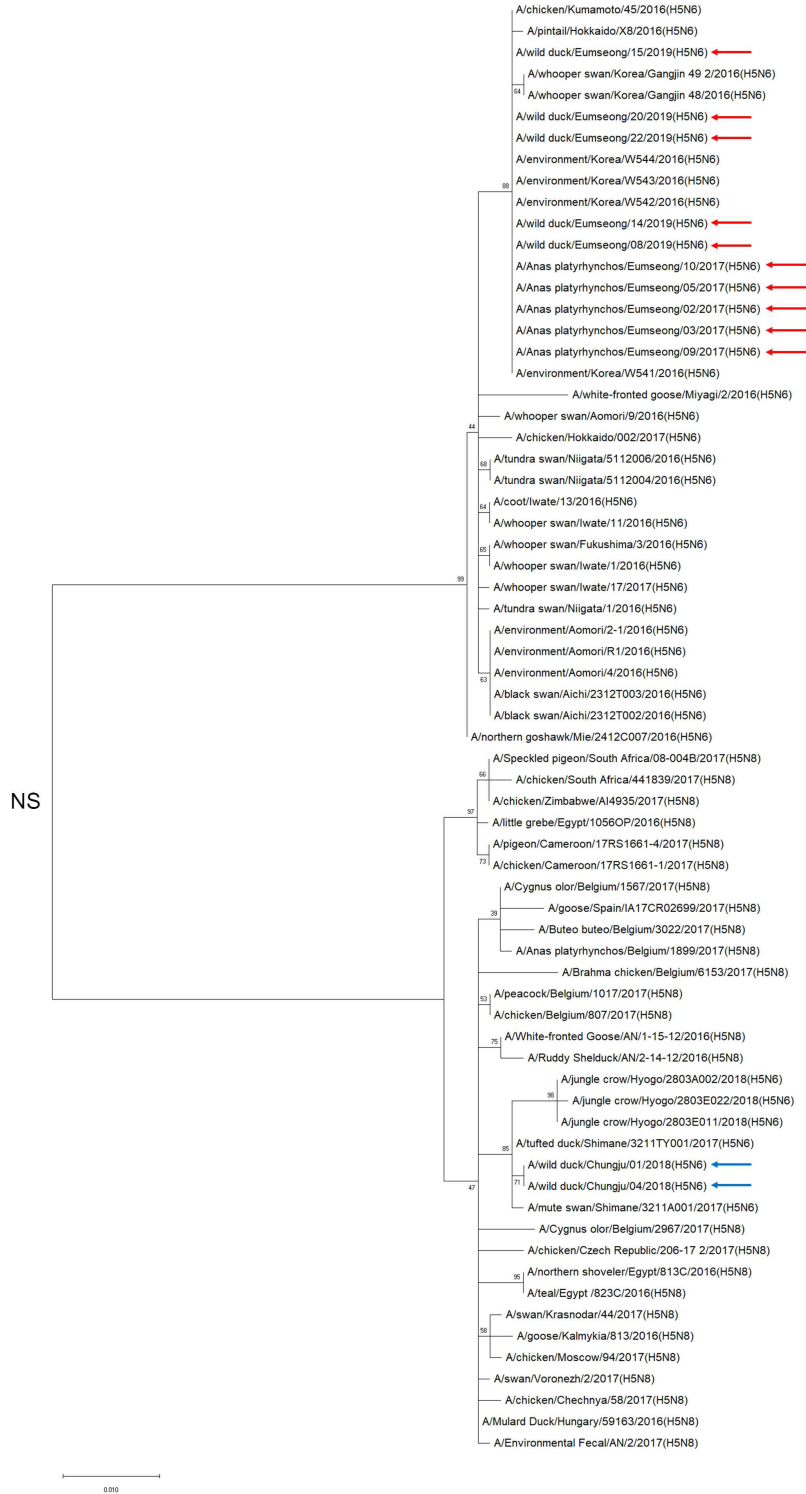


그림 66. H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 NS 유전자 계통분석 결과

- 2017년과 2019년 분리된 H5N6 바이러스주는 A/environment/Korea/W544/2016 (H5N6) 과 가장 유사함을 나타냈으며, A/environment/Korea/W544/2016 (H5N6)주는 유라시아의 조류인플루엔자 바이러스로부터의 최소 3개 아형 (H5N6, H4N2, H1N1)의 재조합 (reassortant)으로 구성됨을 확인하였음 (Euro Surveill. 2017 5; 22)
- 2018년 분리된 H5N6 바이러스주는 A/AP/Korea/612/2017(H5N6)과 가장 유사함을 나타냈으며, 최소 5개 아형 (H5N8, H7N7, H5N1, H10N7, H3N6)의 재조합 (reassortant)으로 구성됨을 확인하였음 (Euro Surveill. 2018; 23)
- 아래 표는 본 분석에 사용된 12종의 조류인플루엔자 바이러스 중 대표적 2종 (2018년 분리주: A/WD/Chungju/01/2018 (H5N6), 2019년 분리주: A/WD/Eumseong/22/2019 (H5N6))와 가장 유사한 염기서열 정보를 나타내고 있으며 해당 정보는 GISAID 데이터베이스에서 추출하였음 (표 9)

표 9. Isolates sharing the highest nucleotide identity (%) with each segment of two representative influenza viruses found in GISAID database

Virus	Gene segment	Virus with the highest nucleotide identity	Identity
A/WD/Eumseong/22/2019 (H5N6)	PB2	A/EM/Korea/W544/2016 (H5N6)	100
	PB1	A/EM/Korea/W544/2016 (H5N6)	99.91
	PA	A/DK/Korea/ES2/2016 (H5N6)	100
	HA	A/DK/Korea/ES2/2016 (H5N6)	99.94
	NP	A/EM/Korea/W544/2016 (H5N6)	100
	NA	A/WS/Korea/Gangjin49_2/2016 (H5N6)	99.78
	M	A/EM/Korea/W544/2016 (H5N6)	100
	NS	A/EM/Korea/W544/2016 (H5N6)	100
A/WD/Chungju/01/2018 (H5N6)	PB2	A/JC/Hyogo/2803E024C/2018 (H5N6)	99.60
	PB1	A/JC/Hyogo/2803E027T/2018 (A/H5N6)	99.61
	PA	A/MS/Shimane/3211A001/2017 (H5N6)	99.76
	HA	A/MS/Shimane/3211A001/2017 (H5N6)	99.82
	NP	A/TD/Shimane/3211TY001/2017 (H5N6)	99.79
	NA	A/JC/Hyogo/2803E023C/2018 (A/H5N6)	99.71
	M	A/JC/Hyogo/2803E024C/2018 (A/H5N6)	99.79
	NS	A/MS/Shimane/3211A002/2017 (H5N6)	99.88

라. 분석 결과 2- H5N6의 분자적 특성

- 분석대상 검체 12종에 대해 분자적 특성을 분석하였음
- 2017년에서 2019년 기간 동안 분리된 H5N6 바이러스주는 모두 HA 유전자 cleavage site에 polybasic residue (RERRRKR/G)를 포함하였음 (표 10)

표 10. HA 유전자 cleavage site 분석 결과

Viruses*	HA clade	HA sequence (aa)
		cleavage site 335-348**
AP/Eumseoung/02/17	2.3.4.4	RERRR_KR/G
AP/Eumseoung/03/17	2.3.4.4	RERRR_KR/G
AP/Eumseoung/05/17	2.3.4.4	RERRR_KR/G
AP/Eumseoung/09/17	2.3.4.4	RERRR_KR/G
AP/Eumseoung/10/17	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Chungju/01/18	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Chungju/04/18	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Eumseoung/08/19	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Eumseoung/14/19	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Eumseoung/15/19	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Eumseoung/20/19	2.3.4.4	RERRR_KR/G
WD/Eumseoung/22/19	2.3.4.4	RERRR_KR/G
AP/Korea/W612/17	2.3.4.4	REKRRK_/G
EM/Korea/W541/16	2.3.4.4	RERRRK_/G
MD/Korea/W452/14	2.3.4.4	RERRRK_/G
Brk/Korea/Gochang1/14	2.3.4.6	REKRRK_/G
Mdk/Korea/W401/11	2.3.2	RERRR_KR/G
EM/Korea/W148/06	2.2	GERRRKKR/G
Yunnan/China/14563/15***	2.3.4.4	RERRR_KR/G
Guangdong/China/SZ872/15***	2.3.4.4	RERRR_KR/G
Guangdong/China/ZQ874/15***	2.3.4.4	RERRR_KR/G
Jiangsu/China/32888/15***	2.3.4.4	RERRR_KR/G

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

** H3 numbering.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- 이러한 polybasic residue는 닭에서 고병원성을 나타내는 특징 중 하나임
- 분리된 모든 조류인플루엔자 바이러스들은 clade 2.3.4.4에 속했으며 이는 인체감염 및 species barrier를 유발한 보고가 있음 (mSphere. 2018; 3)
- 이외에도 분리된 12종의 H5N6 조류인플루엔자 바이러스들은 모두 헤마글루티닌 유전자의 226 amino acid 위치에 glutamine residue, 228 amino acid 위치에 glycine residue를 포함하고 있었음 (표 11, H3 numbering 기준)

표 11. HA 유전자 receptor binding site 분석 결과

Viruses*	HA sequence (aa)							
	Receptor binding sites							
	158	193	222	224	226	227	228	318
AP/Eumseoung/02/17	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
AP/Eumseoung/03/17	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
AP/Eumseoung/05/17	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
AP/Eumseoung/09/17	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
AP/Eumseoung/10/17	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Chungju/01/18	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Chungju/04/18	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Eumseoung/08/19	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Eumseoung/14/19	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Eumseoung/15/19	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Eumseoung/20/19	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
WD/Eumseoung/22/19	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
AP/Korea/W612/17	N	N	Q	N	Q	R	G	T
EM/Korea/W541/16	N	N	Q	N	Q	Q	G	T
MD/Korea/W452/14	N	N	Q	N	Q	R	G	T
Brk/Korea/Gochang1/14	N	N	Q	N	Q	R	G	T
Mdk/Korea/W401/11	D	R	K	N	Q	S	G	T
EM/Korea/W148/06	N	K	K	N	Q	S	G	T
Yunnan/China/14563/15***	N	N	Q	N	Q	R	G	T
Guangdong/China/SZ872/15***	N	N	Q	N	Q	S	G	T
Guangdong/China/ZQ874/15***	N	N	Q	N	Q	R	G	T
Jiangsu/China/32888/15***	N	N	Q	N	Q	G	G	T

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

** H3 numbering.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- 이는 조류에 특이적인 receptor binding specificity (α -2,3 linked sialic acid [SA])를 의미함
- 또한 분리된 12종의 H5N6 조류인플루엔자 바이러스들은 모두 polymerase basic PB1-F2 protein 활성을 지니고 있음이 확인되었으며 (표 12), 이는 in vivo 연구에서 바이러스의 pathogenicity에 기여함이 보고된 바 있음 (J Virol. 2006; 80:7976-83)

표 12. HA 유전자 PB1-F2 protein 분석 결과

Viruses*	Expression of PB1-F2 protein
AP/Eumseoung/02/17	YES
AP/Eumseoung/03/17	YES
AP/Eumseoung/05/17	YES
AP/Eumseoung/09/17	YES
AP/Eumseoung/10/17	YES
WD/Chungju/01/18	YES
WD/Chungju/04/18	YES
WD/Eumseoung/08/19	YES
WD/Eumseoung/14/19	YES
WD/Eumseoung/15/19	YES
WD/Eumseoung/20/19	YES
WD/Eumseoung/22/19	YES
AP/Korea/W612/17	YES
EM/Korea/W541/16	YES
MD/Korea/W452/14	YES
Brk/Korea/Gochang1/14	YES
Mdk/Korea/W401/11	YES
EM/Korea/W148/06	YES
Yunnan/China/14563/15***	YES
Guangdong/China/SZ872/15***	YES
Guangdong/China/ZQ874/15***	YES
Jiangsu/China/32888/15***	YES

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- 헤마글루티닌 유전자의 133 amino acid 위치 결손 (deletion)은 인체감염 H5N6 조류인플루엔자 바이러스에서 흔하게 관찰되는 현상 중 하나임
- 이에 대한 분석 결과에서, 2017년과 2019년 분리된 H5N6 바이러스주는 헤마글루티닌 유전자의 133 amino acid 위치 결손을 포함하고 있는 반면 2018년 분리된 H5N6 바이러스주는 해당 위치의 결손이 발견되지 않았음 (표 13)

표 13. HA 유전자 133 amino acid deletion 분석 결과

Viruses*	HA del
	133
AP/Eumseoung/02/17	YES
AP/Eumseoung/03/17	YES
AP/Eumseoung/05/17	YES
AP/Eumseoung/09/17	YES
AP/Eumseoung/10/17	YES
WD/Chungju/01/18	NO
WD/Chungju/04/18	NO
WD/Eumseoung/08/19	YES
WD/Eumseoung/14/19	YES
WD/Eumseoung/15/19	YES
WD/Eumseoung/20/19	YES
WD/Eumseoung/22/19	YES
AP/Korea/W612/17	NO
EM/Korea/W541/16	YES
MD/Korea/W452/14	NO
Brk/Korea/Gochang1/14	NO
Mdk/Korea/W401/11	NO
EM/Korea/W148/06	NO
Yunnan/China/14563/15***	YES
Guangdong/China/SZ872/15***	YES
Guangdong/China/ZQ874/15***	NO
Jiangsu/China/32888/15***	YES

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- 뉴라미니데이즈 유전자의 아미노산 49 에서 68 위치의 결손변이는 오리 등의 물새에서 가금류로의 조류인플루엔자 전파에서 흔하게 관찰되는 변이로 알려져 있음 (J Virol. 2012; 86(1):584-8)
- 이에 대한 분석 결과에서, 2017년과 2019년 분리된 H5N6 바이러스주는 뉴라미니데이즈 유전자의 아미노산 49 에서 68 위치의 결손변이를 포함하고 있는 반면 2018년 분리된 H5N6 바이러스주는 해당 위치의 결손이 발견되지 않았음 (표 14)

표 14. NA 유전자 49-68 amino acid deletion 분석 결과

Viruses*	NA stalk del
	49-68
AP/Eumseoung/02/17	YES
AP/Eumseoung/03/17	YES
AP/Eumseoung/05/17	YES
AP/Eumseoung/09/17	YES
AP/Eumseoung/10/17	YES
WD/Chungju/01/18	NO
WD/Chungju/04/18	NO
WD/Eumseoung/08/19	YES
WD/Eumseoung/14/19	YES
WD/Eumseoung/15/19	YES
WD/Eumseoung/20/19	YES
WD/Eumseoung/22/19	YES
AP/Korea/W612/17	NO
EM/Korea/W541/16	YES
MD/Korea/W452/14	NO
Brk/Korea/Gochang1/14	NO
Mdk/Korea/W401/11	YES
EM/Korea/W148/06	YES
Yunnan/China/14563/15***	YES
Guangdong/China/SZ872/15***	YES
Guangdong/China/ZQ874/15***	YES
Jiangsu/China/32888/15***	YES

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- NS1 유전자의 92 amino acid 위치에 glutamic residue는 인터페론 베타의 생성을 억제하여 숙주의 항바이러스 반응을 약화시키는데 관여하는 것으로 알려져 있으며 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(35):13093-8), NS1 유전자의 보존된 C-terminal ESEV amino acid motif는 쥐에서 병독성을 증가시키는 것으로 알려져 있음 (J Virol. 2010; 84(13):6733-47)
- 이에 대한 분석 결과에서, 2017년과 2019년 분리된 H5N6 바이러스주는 NS1 유전자의 92 amino acid 위치에 glutamic residue와 NS1 유전자의 보존된 C-terminal ESEV amino acid motif를 포함하고 있는 반면, 2018년 분리된 H5N6 바이러스주는 해당 위치의 변이들이 검출되지 않았음 (표 15)

표 15. NS1 유전자 92 amino acid 및 C-terminal 분석 결과

Viruses*	NS1		
	Del of aa 80-84	aa residue at	
		92	C-term
AP/Eumseoung/02/17	YES	E	ESEV
AP/Eumseoung/03/17	YES	E	ESEV
AP/Eumseoung/05/17	YES	E	ESEV
AP/Eumseoung/09/17	YES	E	ESEV
AP/Eumseoung/10/17	YES	E	ESEV
WD/Chungju/01/18	NO	D	GSEV
WD/Chungju/04/18	NO	D	GSEV
WD/Eumseoung/08/19	YES	E	ESEV
WD/Eumseoung/14/19	YES	E	ESEV
WD/Eumseoung/15/19	YES	E	ESEV
WD/Eumseoung/20/19	YES	E	ESEV
WD/Eumseoung/22/19	YES	E	ESEV
AP/Korea/W612/17	NO	D	GSEV
EM/Korea/W541/16	YES	E	ESEV
MD/Korea/W452/14	NO	D	ESEV
Brk/Korea/Gochang1/14	NO	D	ESEV
Mdk/Korea/W401/11	YES	D	ESEV
EM/Korea/W148/06	YES	D	ESKV
Yunnan/China/14563/15***	NO	D	KPEV
Guangdong/China/SZ872/15***	NO	D	KPEV
Guangdong/China/ZQ874/15***	YES	E	ESEV
Jiangsu/China/32888/15***	YES	E	ESEI

*The viruses in bold was the influenza A (H5N6) viruses isolated from 2017 to 2019 in this study.

***Human isolates.

aa: amino acid; del: deletion; AP: anas platyrhynchos; WD: wild duck; EM: environment; MD: mallard; Brk: breeder duck; Mdk: mallard duck

- 위의 결과를 종합하여 2017년과 2019년 분리된 한국의 조류인플루엔자 바이러스주는 병독성이 높을 것으로 추정되며 2018년 분리주는 병독성이 낮을 것으로 추정됨
- 실제 H5N6 조류인플루엔자 바이러스는 한국에서 2017-2017 조류독감 발병을 유발하였으며 World Organisation for Animal Health (OIE) 분류에 의해 병독성이 높은 것으로 확인되었음 (Euro Surveill. 2017; 22)

마. 한국에서 H5N6의 발생 특성

- 2014년 한국에서 H5N8 조류인플루엔자 바이러스에 의한 발병이 일어난 이래로 재조합 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 의한 발병이 지속적으로 발생하고 있음 (Clin Exp Vaccine Res. 2017; 6(2):95-103; Emerg Infect Dis. 2015; 21(2):298-304)
- 특히 2016/17 겨울 분리된 고병원성 H5N6 바이러스는 충청북도 음성 지역을 포함한 한국의 대부분의 지역에서 조류독감 발병을 유발하였으며, 해당 바이러스는 유라시아 조류인플루엔자 바이러스 H5N6, H4N2, H1N1의 재조합바이러스임이 규명된 바 있음
- 본 연구에서 분석한 H5N6 조류인플루엔자 바이러스 중, 2017년과 2019년 분리된 바이러스주는 계통분석에서 2016/17 한국에서 분리된 H5N6와 함께 클러스터 되었으며, 각 바이러스 간 소수의 돌연변이만이 확인되었음
- 유전적으로 동일한 조류인플루엔자 바이러스가 동일 지역에서 2016년부터 3년간 반복적으로 검출되었다는 점은 고병원성 H5N6 조류인플루엔자 바이러스가 국내에 토착화되었을 수 있음을 시사함
- 2017년과 2019년 분리된 바이러스는 계통분석에서 인체감염을 일으킨 것으로 보고된 H5N6 바이러스주와 함께 클러스터되었으며 분자적 특성 분석에서도 해당 바이러스가 병독성이 높은 것으로 나타났음
- 분석된 조류인플루엔자 바이러스들은 모두 헤마글루티닌 유전자의 Q226L과 G228S 돌연변이가 검출되지 않았으며, 해당 돌연변이들은 human adaptation을 증가시키는 것으로 알려져 있음
- 또한 병독성과 포유류 adaptation을 증가시키는 데 연관되어 있는 PB2 유전자의 E627K 및 D701N 돌연변이들 또한 본 연구검체에서 검출되지 않았음
- 중국에서의 인체감염 H5N6 바이러스 또한 헤마글루티닌의 Q226L 및 G228S 돌연변이를 포함하지 않았다는 사실은 고병원성 H5N6 조류인플루엔자 바이러스의 소변이가 인체감염에 필수적이지 않다는 점을 시사함
- 따라서 본 연구에서 분석한 2017년 및 2019년 분리 H5N6 조류인플루엔자 바이러스들은 인체감염의 잠재성을 갖추고 있을 수 있으며, 이러한 결과 확인을 위해서는 추가적인

검증 연구가 필요함

- 또한 본 연구 결과는 야생조류와 가금류 모두에서의 상시 조류인플루엔자 바이러스의 예찰 필요성을 강조하고 있음

바. H5N3의 분석 결과

- 본 연구를 통하여 수집된 조류 인플루엔자 바이러스 중 2019년 1월부터 8월까지의 기간 동안충청북도 음성군에서 총 4개의 H5N3 바이러스가 분리됨
- 분석 결과, 위의 4개의 H5N3 바이러스는 중국에서 분리된 H5N3 (2017), 한국에서 분리된 H4N6 (2017) 와 H3N1 (2016)의 재조합을 통해 이전에는 존재하지 않았던 새로운 조합의 H5N3 바이러스이고, 각 바이러스 간 소수의 돌연변이만이 확인되었음
- 아래 그림은 헤마글루티닌 유전자 및 뉴라미니데이즈 유전자의 계통분석 결과를 나타내고 있으며 빨간색 화살표는 2019년에 분리된 검체를 나타냄 (그림 67 - 그림 68)

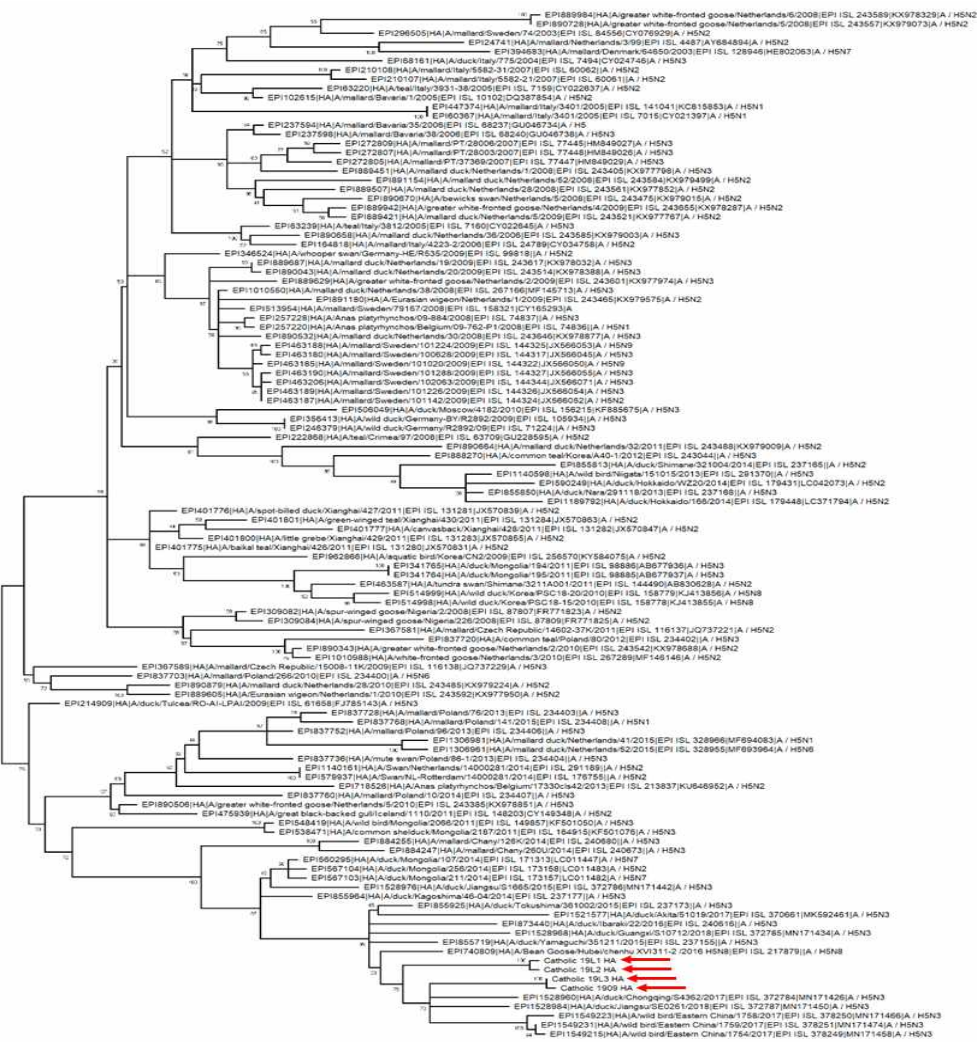


그림 67. H5N3 조류인플루엔자 바이러스의 HA 유전자 계통분석 결과

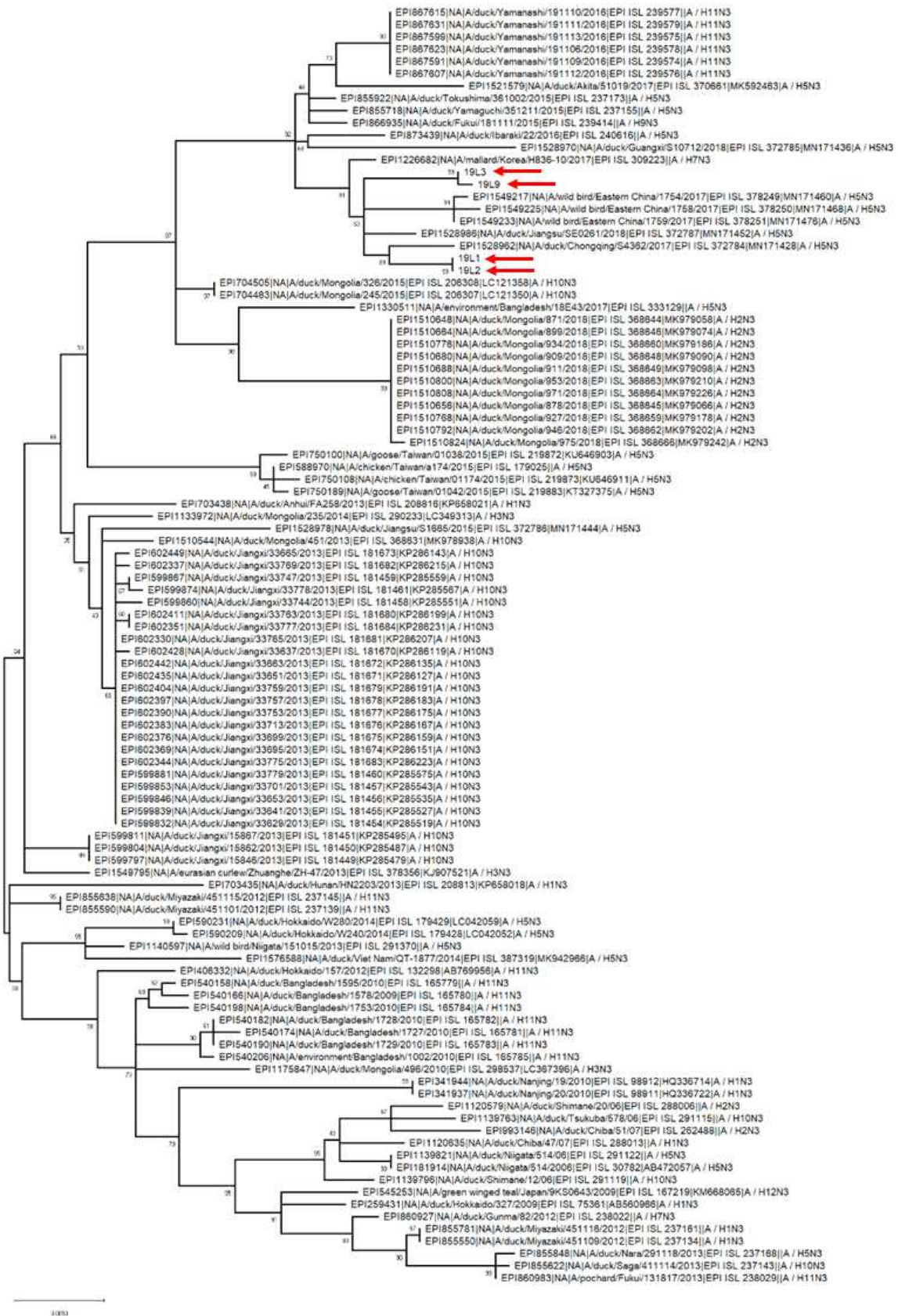


그림 68. H5N3 조류인플루엔자 바이러스의 NA 유전자 계통분석 결과

- 또한, 해당 H5N3 바이러스의 HA 분석을 통하여 EA-nonGsGD clade의 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스임을 알 수 있었음

사. 2019년 겨울 분리된 조류인플루엔자 바이러스

- 2019년 10월과 11월에 2개의 H5N6 바이러스, 2개의 H3N6 바이러스, 4개의 H3N8 바이러스가 분리되었음
- 해당 8개의 조류인플루엔자 바이러스의 경우 모두 저병원성 조류인플루엔자 바이러스임
- 해당 8개의 조류인플루엔자 바이러스의 경우 모두 음성에서 발견되었고, 이를 통해 H5N6, H3N6, H3N8 바이러스의 공동 순환 (co-circulation) 가능성을 제시할 수 있음

제 6 절 조류인플루엔자 바이러스 전파특성 및 전파경로

가. 야외 조류 분변에서 바이러스 검출

- 조류인플루엔자 바이러스는 원칙적으로 조류에 감염, 폐사를 일으키는 질병이지만 장기간 사람이나 다른 포유류가 장기간 조류 인플루엔자 바이러스에 노출되면 증상이 발현될 수 있음
- 1990년대 부터 시작된 공장식 가금류 사육은 대규모 조류 인플루엔자 발생과 매우 밀접한 관계가 있으며 특히 우리나라처럼 면적이 좁은 곳에서 생산성 향상을 위한 공장식 사육은 조류인플루엔자 바이러스에 매우 취약하며 이에 대한 대책이 절실함
- 조류인플루엔자 바이러스를 분리하기 위하여 음성 118건, 충주 92건, 제천 20건, 청주 15건, 괴산 15건, 진천 10건, 증평 5건의 야외시료를 수거하여 부화란에 접종하여 검사한 결과 총 22건의 바이러스가 분리되었으며 이중에서 음성지역에서 16건으로 전체 양성 73%, 충주지역에서 6건으로 바이러스가 분리되어 27%였음 (그림 69)
- 조류 인플루엔자 바이러스 검출은 전체 275건 중에서 22건으로 검출율은 8% 였음

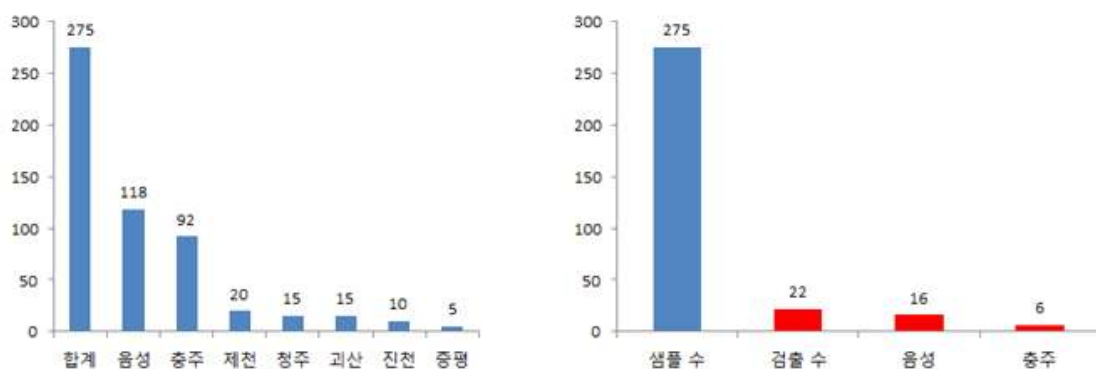


그림 69. 지역별 야외 샘플 수거수 및 양성 검체 수

- 바이러스 검출율에서 나타난 바와 같이 음성지역이 22건중 16건 73 %의 검출율은 보이는데 음성지역 야외시료는 특히 조류 인플루엔자 발생이 많았던 맹동면 지역을 중점적으로 실시한 바 이 지역을 비롯한 조류 인플루엔자 발생이 잦은 지역은 이미 바이러스가 토착화된 것으로 판단됨
- 야외시료 수거지역은 주로 철새가 많이 이주하는 지역과 주기적으로 조류 인플루엔자가 발생하는 지역을 중심으로 하였음

나. 야외 바이러스 검출 지역에서 전파경로 분석

- 조류인플루엔자의 전파경로를 분석하기 위하여 축사 주변 설치류(야생쥐)를 포획하였음
- 야생쥐 포획 지역은 야생 조류 분변에서 바이러스가 검출된 지역에서 중점적으로 포획하여 항원 및 항체 검사를 실시하였음
- 야외 조류 분변에서 조류 인플루엔자 바이러스가 많이 발견된 음성, 충주 지역을 중심으로 야생 설치류(야생쥐)를 포획하여 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 검사 결과, 음성 지역에서는 37마리의 야생쥐를 포획하여 이중에서 항원과 항체가 동시에 발견된 것은 3마리, 항원만 발견된 것은 5마리, 항체만 검출된 것은 3마리였음 (그림 70)

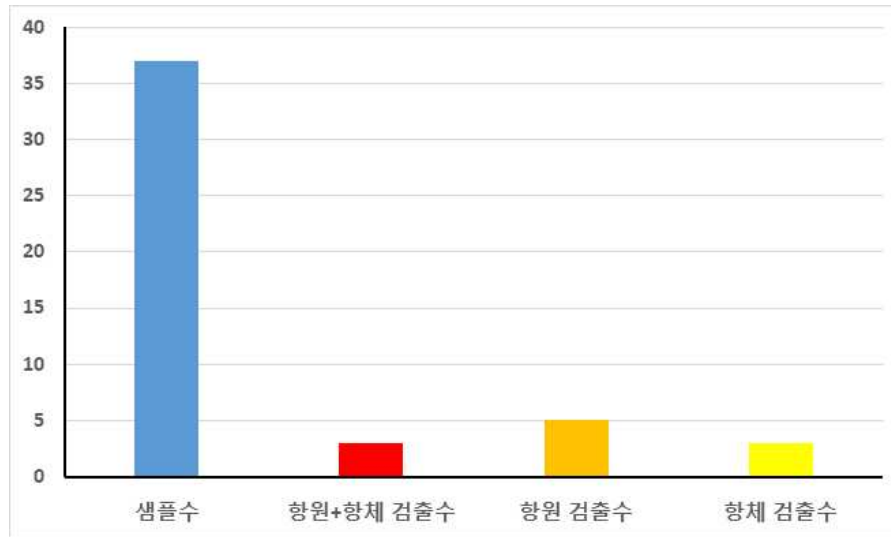


그림 70. 설치류 조류인플루엔자 바이러스 검사 결과

- 가금 농장 인근에서 포획한 야생쥐에서는 항원과 항체를 동시에 가진 개체와 항체만을 가진 개체는 발견되지 않았고 항원만 검출된 개체가 2마리였음
- 가금 농장 인근 저수지에서 포획한 야생쥐에서는 항원과 항체가 동시에 검출된 개체가 3마리, 항원은 검출되었으나 항체가 검출되지 않은 개체가 3마리, 항체만 검출된 개체가 3마리로 나타났음

- 충주지역에서는 총 5마리를 포획했으며, 이중에서 항원과 항체가 동시에 검출된 개체가 1마리, 항원만 검출된 개체는 한 마리도 없었으며 항체만 검출된 개체는 4마리였음
- 충주지역 가금농장 인근에서 포획된 야생쥐에서 항원, 항체가 동시에 검출된 개체가 1마리, 항체만 검출된 개체가 4마리 었음
- 가금 농장 인근에 위치한 저수지에서는 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항원과 항체를 검출할 수 없었음
- 아래 그림은 지역별 포획한 설치류의 조류인플루엔자 바이러스 검사 결과를 보여주고 있음 (그림 71)

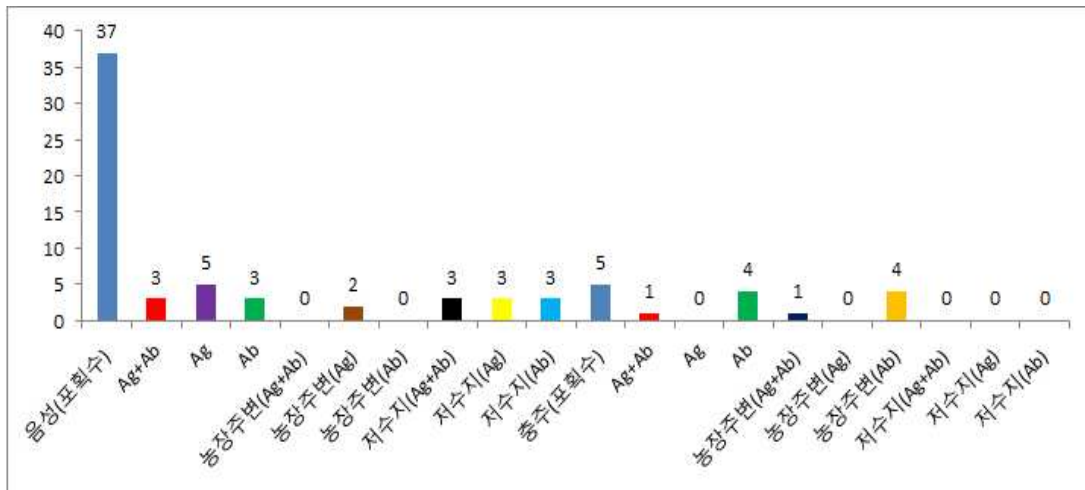


그림 71. 야생 설치류(야생쥐)에서 조류 인플루엔자 바이러스 검출 결과
 농장주변: 가금류 축사 인근; 저수지 : 가금류 축사에서 가까이 위치한 저수지

- 야생쥐에서 분리한 조류 인플루엔자이 혈청형을 분석한 결과 항원은 모두가 공통항원 M 유전자에서는 모두 발현되었으며 모두 H5형으로 나타났으며 H7형은 하나도 나타나지 않았음 (그림 72)

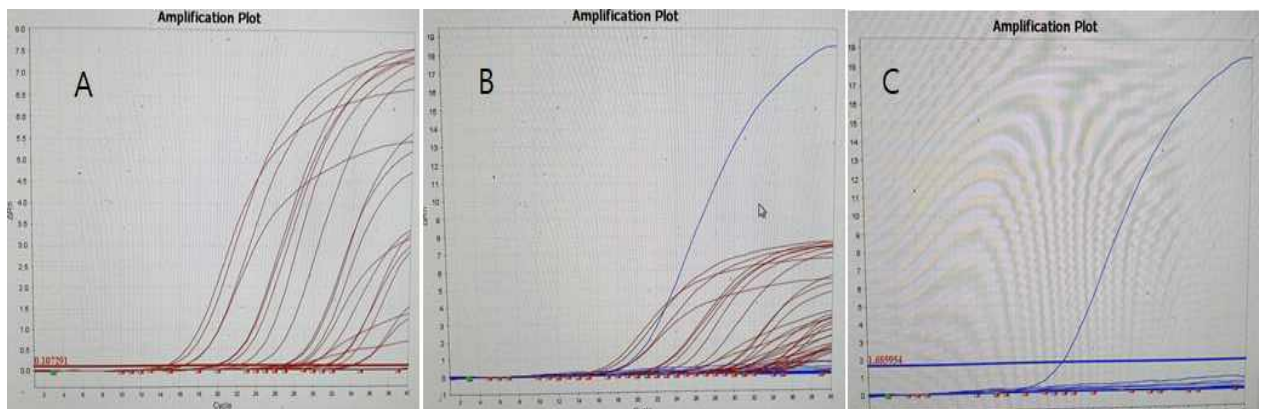


그림 72. 야생 설치류(야생쥐)에서 검출된 조류 인플루엔자 바이러스 H 항원 구분 결과.
 A: M 유전자; B: H5 유전자; C: H7 유전자; 파란색: 표준 양성

- 그림에는 나타나 있지 않지만 항체만 검출된 경우 혈구응집억제 반응에서는 HI 4 - HI 8로 역가는 매우 낮게 나타났음
- 가금 농장 인근에서 포획한 야생쥐에서 항원과 항체가 동시에 검출된 경우가 4건, 항원만 검출된 경우가 5건, 항체만 검출된 경우가 7건으로 나타났으며 또한 농장 근처에 서식하는 야생쥐에서 항원과 항체가 많이 나타나는 관계를 분석할 때 조류 인플루엔자 바이러스가 야외에 가금농장으로, 가금농장에서 가금농장으로 전파하는 과정에는 야생쥐가 그 매개체가 되는 것으로 확인되었음

제 7 절 백신접종이 인체감염에 미치는 영향 분석

가. 조류인플루엔자 백신 접종

- 조류인플루엔자 발생을 예방하기 위해서는 조류에 백신을 접종하는 것이 필수적인 문제로 대두되고 있음
- 하지만 인플루엔자 바이러스가 돼지 등 포유류에 감염을 일으키는 바, 우리나라와 같이 폭발적으로 조류 인플루엔자가 발생하는 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스가 인체 감염으로 발전할 가능성을 배제하기는 매우 곤란한 시점임
- 따라서 조류 인플루엔자 백신접종이 인체에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 시도하고자 하였음
- 병아리는 특정병원체가 없는 (Specific-Pathogen-Free, SPF) 계란을 구입하여 멸균된 부화기에서 부화시켜 6주령에 실험에 사용하였음
- 백신 접종전 채혈을 통해 분리한 혈청을 사용하여 A형 인플루엔자 항체 ELISA 키트 (Bionote, Korea)로 검사를 수행하였음
- 검사 결과 조류 인플루엔자 항체가 존재하지 않는 개체를 실험에 사용하였으며 총 52마리를 사용하였음
- 사용한 조류 인플루엔자 백신은 비비엔+플루 H9N2(중앙백신연구소, Korea)로 2종의 전염성기관지염 바이러스, 뉴캐슬 바이러스, 저병원성 조류 인플루엔자 H9N2 바이러스가 혼합된 불활화 백신을 사용하였음
- 접종은 제조사의 지시대로 닭 1마리당 백신 0.5 ml를 근육에 접종하였음
- 모든 닭의 항체가 PI 값이 90 % 초과할 때 까지 보강 접종 후 실험을 수행하였음
- 백신을 1차 접종시 52마리 중 37마리 항체 양성으로 71 %의 양성율을 나타냈음 (그림 73)
- 2차 보강 접종시에는 52마리중 41마리가 조류 인플루엔자 항체 양성으로 79 %의 양성

율을 보였으며, 양성 개체 중에서도 14마리의 항체역가가 90 % 이하를 나타냈음 (그림 73)

- 3차 보강 접종시에는 52마리중 52마리 모두 항체양성으로 100 %의 양성율을 보였으며 항체역가 역시 90 % 이상을 나타냈음 (그림 73)

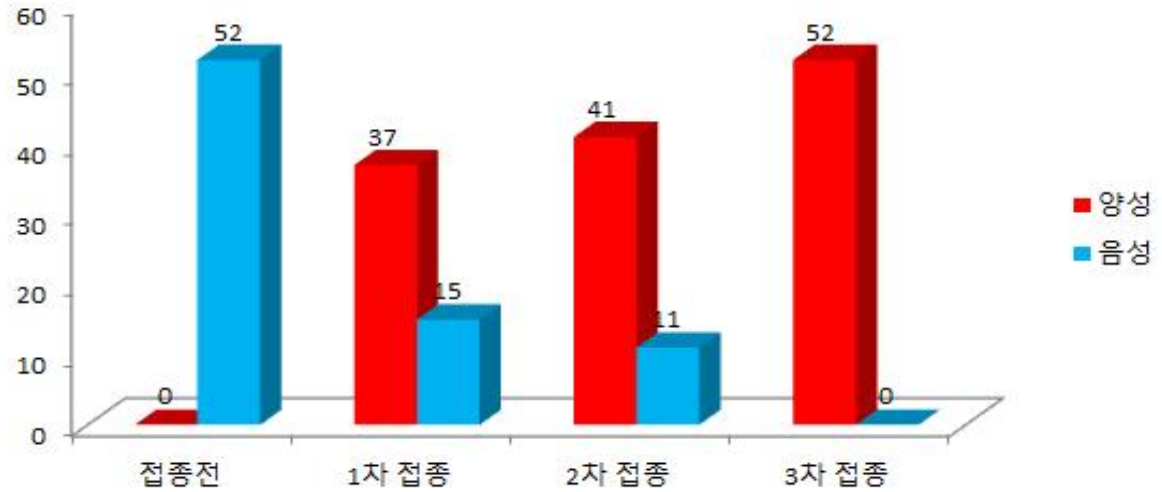


그림 73. 조류인플루엔자 백신 접종 횟수별 양성 비율

- 항원 검사에서도 조류인플루엔자 공통항원 M 유전자, H5 유전자, H7 유전자가 분변에서 발견되지 않는 것을 확인한 후 실험에 사용하였음 (그림 74)

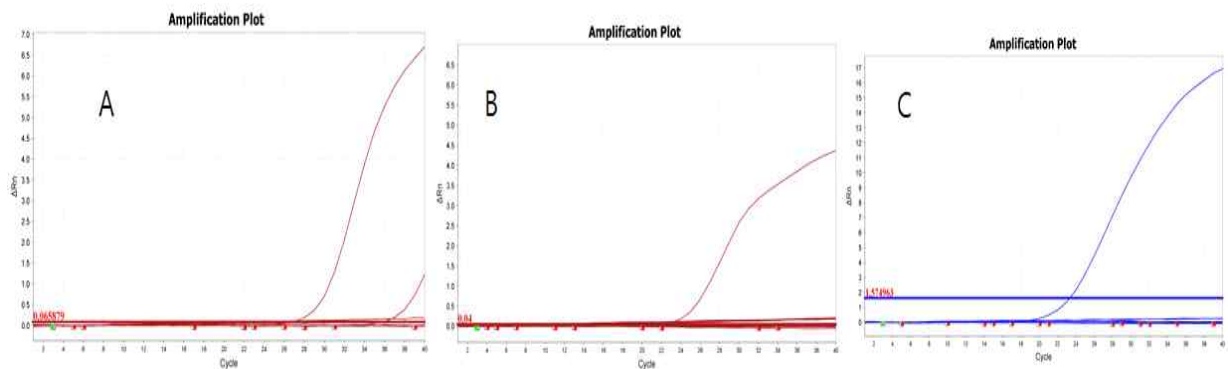


그림 74. 백신 접종전 닭 분변에서 조류 인플루엔자 항원검사 결과
A: M 유전자; B: H5 유전자; C: H7 유전자; 파란색: 표준 양성 시료

나. 백신 접종 조류의 바이러스 접종 후 실험 결과

- 항원 검사에서 음성, 항체 검사에서 혈중 역가가 90 % 이상으로 확인된 3일 후 H5N6 형 및 H7 형 조류 인플루엔자 바이러스의 혈구응집 역가를 8 HAU로 조정한 후 마리당 1 ml를 혈관으로 접종하였음

- 총 2회 걸쳐 접종하였으며 접종간 휴지기는 10일로 하였으며 관찰기간은 10일로 하였음
- 1차 접종 후 10일간 관찰하면서 마지막 10일째 바이러스별 접종 사유사에서 분변을 7점씩 수거하여 항원 존재여부를 조류 인플루엔자 항원 진단 키트 M, H5, H7 항원으로 Real-Time PCR을 이용하여 검사하였음 (그림 75)

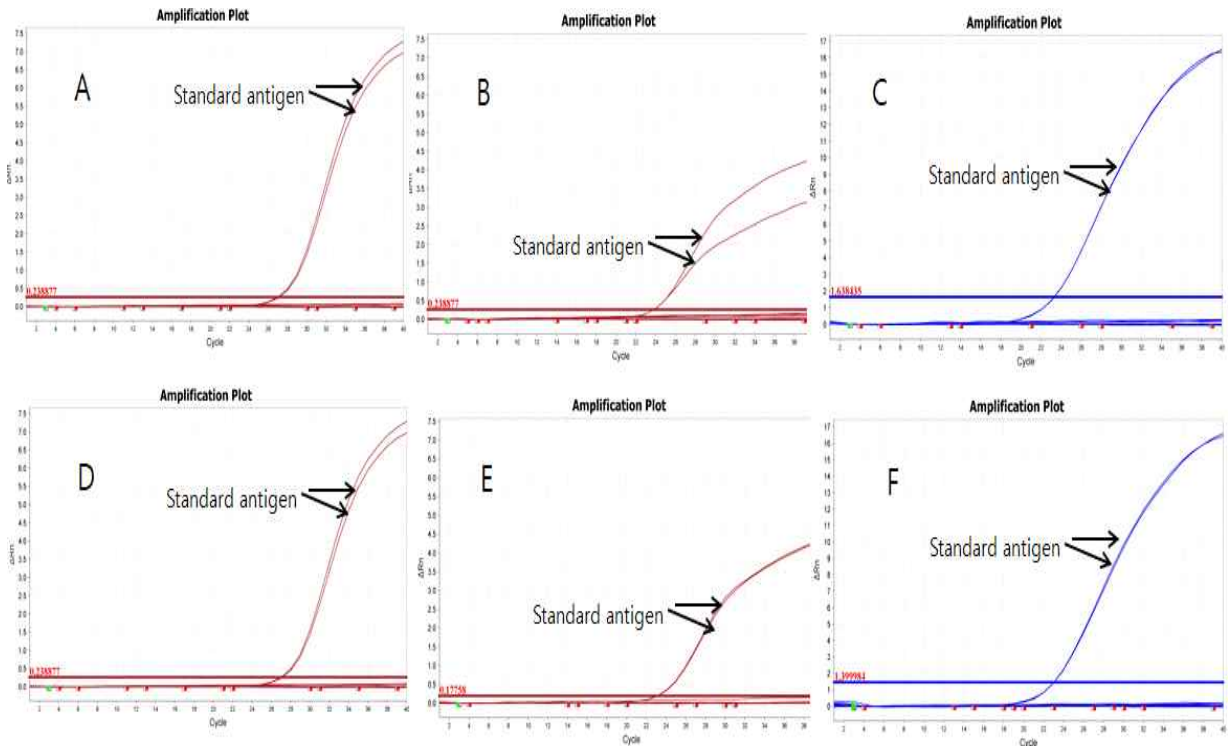


그림 75. 백신접종 닭에 대한 바이러스 접종 후 시간대별 항원 검출 결과
 A, D: M 유전자; B, E: H5 유전자; C, F: H7 유전자; A, B, C: 1차 접종 10일 후 항원검사; D, E, F : 2차 접종 10일 후 항원검사

- 바이러스 1차 접종 10일 후 각 사육장에서 분변을 7점씩 수거하여 항원검사를 실시한 결과, 조류 인플루엔자 공통 항원인 M유전자, 접종 바이러스인 H5, H7 형 모두 검출되지 않았음 (그림 75)
- 바이러스 2차 접종 10일 후에도 각 사육장에서 수거한 분변에서 조류 인플루엔자 유전자인 M유전자, H5 유전자, H7 유전자 모두 검출되지 않았으며 변형된 조류인플루엔자 바이러스를 검출할 수 없었음 (그림 75)
- 이상의 결과에서 백신을 접종할 경우 조류 인플루엔자 발생을 예방할 있다는 결론을 도출하였음

다. 참여 연구원에 대한 조류인플루엔자 항체검사

- 조류에 대한 인플루엔자 백신접종이 인체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백신 접종

후 혈중 항체역가가 90 % 이상 유지한 닭에 대한 조류 인플루엔자 공격 실험 완료 후 바이러스 공격 실험에 참여한 연구원의 바이러스 감염 여부를 알아보기 위하여 혈중 항체검사를 실시한 결과 참여 연구원 모두에서 음성으로 나타났음 (그림 76)

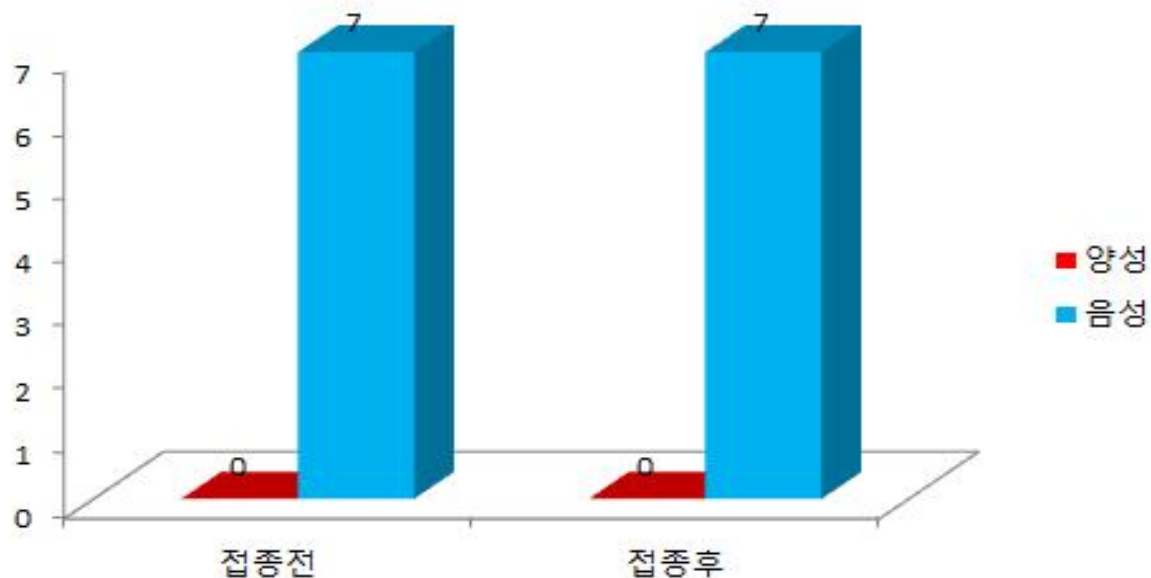


그림 76. 백신접종 닭에 대한 바이러스 접종 실험 후 참여 연구자에 대한 조류인플루엔자 항체 검사 결과

- 이러한 결과를 분석하면 가금류에 조류 인플루엔자 백신을 접종해도 인체에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨
- 그러나 이러한 분석 결과는 국내 질병 규정상 제한된 구역에서 제한된 인플루엔자 바이러스를 이용한 것이기 때문에 자연적인 환경에서 보다 다양한 생물학적 환경에서 이루어진 결과를 통해서 분석해 볼 필요가 있다고 사료됨

제 8 절 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보 데이터베이스 구축

- NGS분석을 통해 생산된 조류인플루엔자 바이러스의 유전자 정보의 데이터베이스를 구축하였음
- 구축된 데이터베이스는 웹 브라우저로 접속 가능하며 NGS에서 생산된 염기서열 원자료 (fasta)를 확인할 수 있도록 하였음
- 서열 데이터는 구조화된 데이터로서 SQL (Structured Query Language)를 이용하여 데이터베이스를 구축하였음
- SQL 데이터베이스 구축에는 MySQL과 SQLite 등을 사용할 수 있음

- 본 과제에서 구축한 데이터베이스는 로컬 서버 형태이며 그 데이터의 크기가 크지 않아 상대적으로 가벼운 SQLite를 사용하여 구축하였음
- 웹 서버는 통계 소프트웨어인 R의 Shiny 라이브러리를 이용하여 구축하였음
- R의 Shiny 라이브러리는 interactive web application을 제작하는 도구로, 웹페이지 구축 및 데이터 시각화에 효과적인 도구임
- 위의 과정으로 구축한 조류인플루엔자 데이터베이스의 전체 구성과 흐름은 다음과 같음 (그림 77)
 - 1. 웹 브라우저 접속 후 쿼리(query)를 서버에 보냄
 - 2. 매개변수로 지정된 샘플이름, 조류인플루엔자 바이러스 아형을 분석함
 - 3. SQLite 데이터베이스에서 쿼리 조건에 맞는 데이터를 얻음
 - 4. 데이터 표 및 서열을 생성하고 웹 브라우저에 표시함

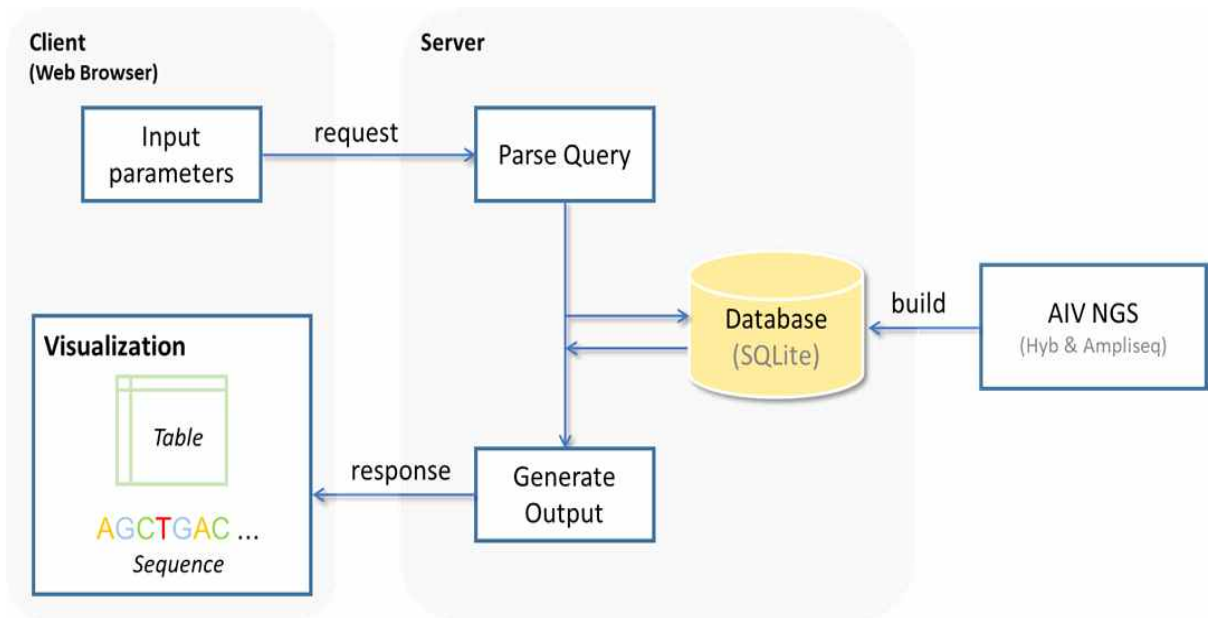


그림 77. 조류인플루엔자 바이러스 데이터베이스의 전체 구성

- 웹 브라우저로 접속 시, 초기 화면에 데이터 표가 나타나며 샘플이름, 조류인플루엔자 바이러스의 8가지 segment (HA, NP, NA, NS, PA, PB1, PB2)를 지정/정렬하여 데이터를 볼 수 있음 (그림 78)

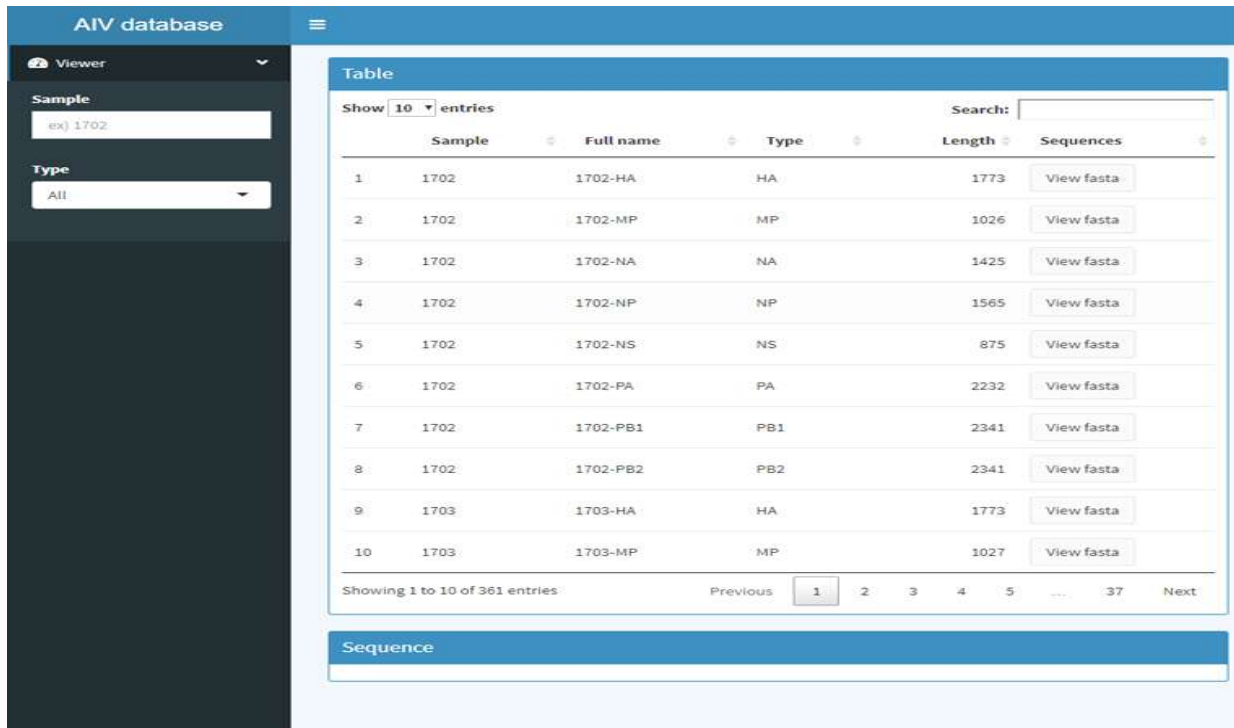


그림 78. 조류인플루엔자 바이러스 데이터베이스 화면 예시

- 초기 화면에는 모든 샘플과 모든 조류인플루엔자 바이러스 segment를 포함한 데이터 표가 나타남 (그림 79)

	Sample	Full name	Type	Length	Sequences
1	1702	1702-HA	HA	1773	View fasta
2	1702	1702-MP	MP	1026	View fasta
3	1702	1702-NA	NA	1425	View fasta
4	1702	1702-NP	NP	1565	View fasta
5	1702	1702-NS	NS	875	View fasta
6	1702	1702-PA	PA	2232	View fasta
7	1702	1702-PB1	PB1	2341	View fasta
8	1702	1702-PB2	PB2	2341	View fasta
9	1703	1703-HA	HA	1773	View fasta
10	1703	1703-MP	MP	1027	View fasta

그림 79. 데이터 표 예시

- 또한 표에서 나타나는 “View fasta” 버튼을 선택하면 각각의 염기서열 정보를 확인할 수 있음 (그림 80)

```

Sequence
>1702-NS
AGCGAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGTTTTTCAGGTAG
ACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAACTGGGTGATGCCCCAT
TCCTTGACCGGCTTCGCCGAGACCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACACTCTTGGTC
TGGACATCGAAACAGCTACTCGTGC GGAAAAACAAATAGTGGAGCGGATTCTTGATGAGG
AACGTGACGAGACACTTAAAATGCCGACCTCACGTTACCTAACTGAAATGACTCTCGAAG
AAATGTCGAGGGACTGGTTCATGCTAATGCCCAAGCAGAAAAGTGGTGGGTTCCCTTTGCA
TCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAAAGCATCATACTGAAAGCAAATTTCAAGTGTGA
TTTTTAACCGGTTAGAGACCCTAATACTACTCAGAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCG
TGGGAGAAATCTCACCATTACCTTCTCTCCAGGACATACTGGCGAGGATGTCAAAAATG
CAATTGGCGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGGGTCTCTGAAG
TTATACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTGATGAGGGTGGGAGACTTCCACTCTCTCAA
ATCAGAAACGGAACTGGCGCAGCAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAAATAAGGTGGCTG
ATTGAAGAAATACGACATAGATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACTTTT
ATGCAAGCCTTACAACACTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAG
CTTATTTAATGATAAAAAACACCCTTGTCTACT

```

그림 80. 선택된 조류인플루엔자 바이러스 염기서열 데이터 제공 예시

- 구축된 조류인플루엔자 바이러스 데이터베이스는 다음의 주소에서 확인 가능함;
http://www.pmrcre.kr/aiv_db/

제 9 절 조류인플루엔자 바이러스 검출기술 개발

가. LAMP 기반 조류인플루엔자 바이러스 검출기술 개발

- 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 조기/정밀 검사는 가금류 등 목축업의 질병 제어 및 사람간의 전이를 조기 차단하기 위하여 그 중요성이 크게 증대되고 있음
- 진단 대상도 가금류전염병의 조기 발결 및 확진을 위한 수의학적 진단 뿐 아니라 사람에게 대한 진단 수요가 증가되고 있음
- 따라서 병원 등에서의 실험실적인 검사 뿐 아니라, 농장, 공항/항만에서의 검역 요구 등의 현장성이 요구되고 있음
- 특히, 농가에서의 자발적인 신고를 위해서는 쉽고 감도가 높은 현장진단법이 필요함
- 현재 조류인플루엔자 바이러스에 대해 현장에서 사용 가능한 간이진단키트는 혈청을 이용한 면역크로마토그래피 원리의 래피드 키트가 있으나, 민감도가 낮다는 문제가 있음 (limit of detection이 TCID 기준으로 10⁴-10⁵)
- 기존 현장진단키트의 문제점을 개선한 새로운 현장진단 분석 기술이 필요함에 따라 정확도가 높

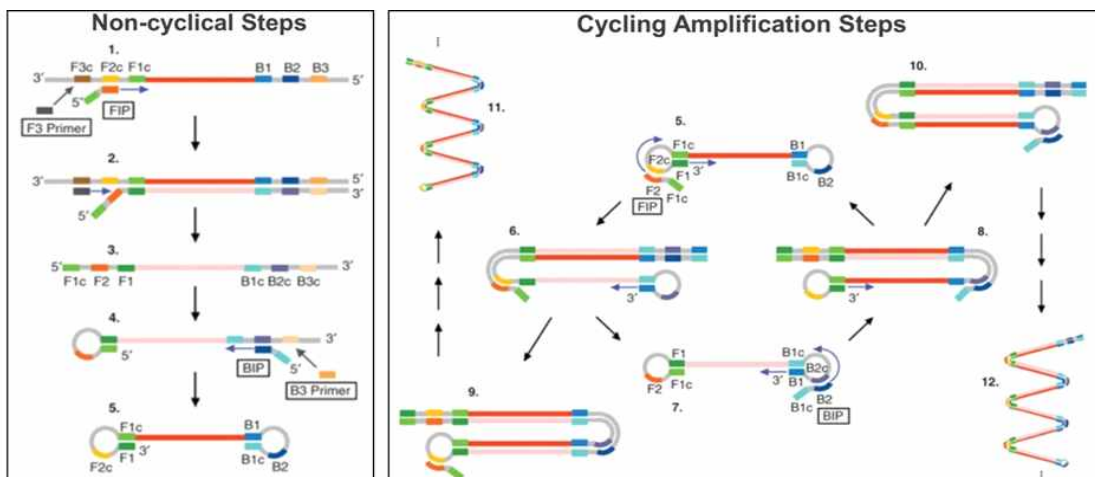
은 유전자 진단법을 차용하되, 다음의 4가지 요구조건 (신속성, 민감성, 다양성, 간편함) 을 만족 하는 등온 증폭 기반의 핵산 검출 기술이 현장 진단에 적합한 기법으로 판단하였음 (그림 81)



등온 증폭 기반의 핵산 검출 기술

그림 81. 현장 진단 검출기술의 요구 조건

- 대표적인 핵산 등온증폭기술로 꼽히는 LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 방식은 가닥 변위 활성이 높은 *Bst polymerase*를 이용하여 표적이 되는 핵산에서 6개 부분을 인식하도록 고안된 4개의 프라이머 (outer primer F3, B3, inner primer FIP, BIP) 에 의해 루프 구조를 만들어 사슬치환반응으로 증폭이 이루어짐 (그림 82)



- ✓ 단일 온도에서 증폭이 이루어짐
- ✓ 가닥 변위 활성이 높은 (high strand displacement activity) 중합효소를 사용함
- ✓ 빠른 증폭이 가능함
- ✓ DNA/RNA 타겟이 모두 가능함

Eiken Chemical Co., Ltd, <http://loopamp.eiken.co.jp/>

그림 82. LAMP 기술의 개념도

- LAMP는 표적이 되는 핵산에서 6개의 부분을 선택해야 하는 점에서 프라이머의 제작이 복잡하고 짧은 길이의 표적에는 적용할 수 없는 단점이 있음
- 하지만, 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때 표적 핵산에 대한 특이성이 매우 높다는 장점을 나타냄
- 더불어 등온에서 증폭이 이루어져 온도 조절이 필요 없기 때문에 온도 변화에 따른 핵산의 손상이 없음
- 따라서 기존 증폭방식에 비해 증폭 효율이 높으며, 상대적으로 간단한 장비만을 가지고 짧은 반응시간 내에 핵산 증폭이 가능함
- LAMP를 통하여 증폭된 산물은 반응 부산물인 피로인산 마그네슘 (magnesium pyrophosphate) 침전에 의한 탁도 측정, 형광 염료인 SYBR Green 등을 이용한 형광 검출, 전기영동 등의 방법을 통해 확인할 수 있음
- 이 중, 탁도 측정법과 형광 측정법은 실시간으로 증폭 산물을 검출할 수 있기 때문에 현장 적용성을 극대화할 수 있는 방법임 (그림 83)

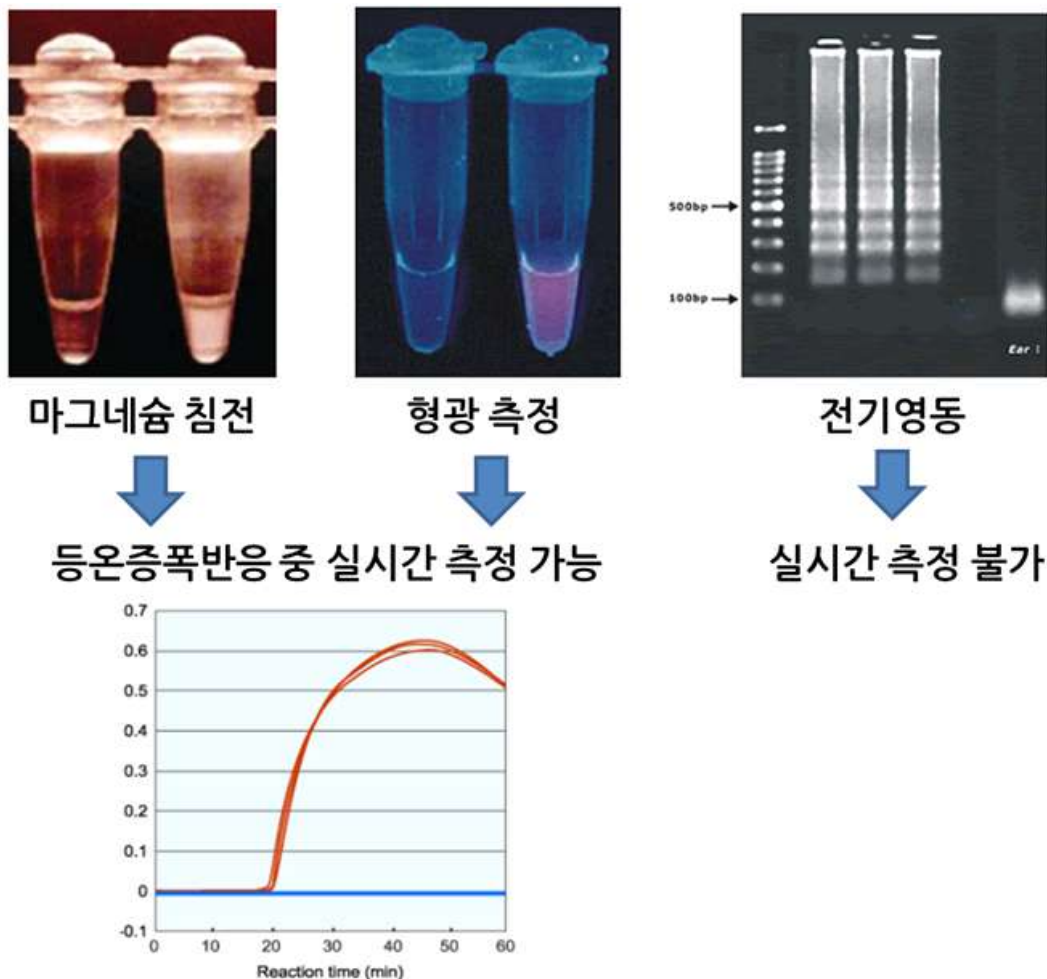


그림 83. LAMP의 탁도기반 검출 방법

나. LAMP 프라이머 설계

- 서로 다른 8개의 RNA 분절로 이루어진 조류인플루엔자 바이러스에서 공통적인 서열을 갖는 분절인 MP (matrix protein)과 함께 아형을 구분할 수 있는 헤마글루티닌 (hemagglutinin, HA)과 뉴라미니데이즈 (neuraminidase, NA)를 검출 타겟으로 정하였음
- 조류인플루엔자 바이러스의 아형 중 H5, H9 아형의 HA와 N6 아형의 NA 염기서열을 입수하였고, dnastar 프로그램을 이용하여 이들로부터 각각의 보존된 영역을 선별하였음 (그림 84)

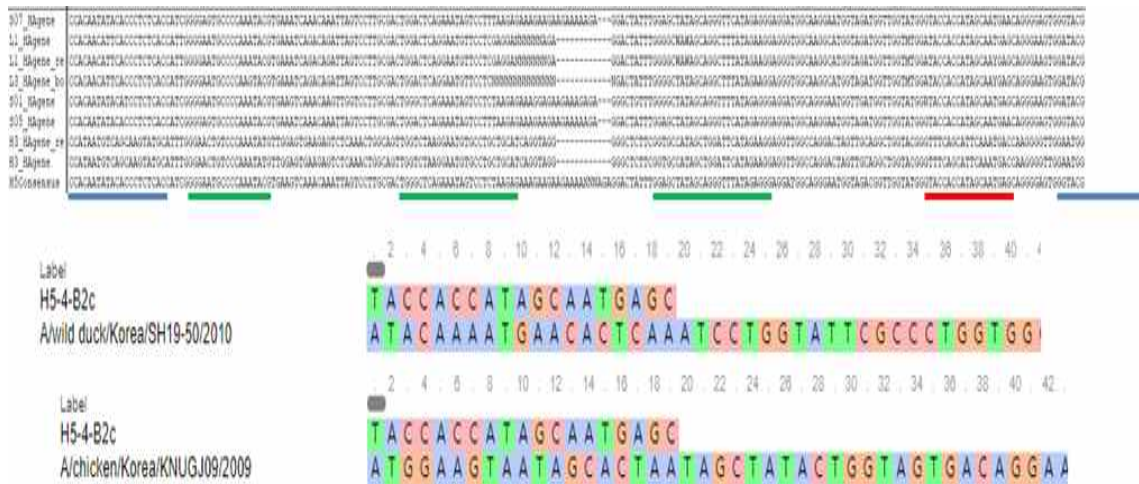


그림 84. 조류인플루엔자의 보존된 염기서열 획득 예시

- 각각의 아형에 특이적인 LAMP 프라이머는 PrimerExplorer v5 (<https://primerexplorer.jp/e/index.html>) 를 이용하여 설계하였음
- 설계 조건은 설계 프로그램의 기본 설정값을 기본으로 하였으며, 기본값으로 설계되지 않는 영역에 대해서는 GC percent, Tm value, 5' / 3' stability 등의 값을 변경하여 설계하였음
- 설계된 프라이머는 loop primer T 염기에 FAM 염료를 태그하여 증폭이 일어나면 FAM 형광을 검출할 수 있는 바, 서열 특이적인 증폭 양상을 형광으로도 검출할 수 있음. 이를 통해 대부분의 실험실에 보유중인 real-time PCR 장비에 활용 가능함
- 본 연구개발을 통해 총 12종의 조류인플루엔자 바이러스 LAMP 프라이머를 설계하여 증폭 반응을 확인하였으며, 그 중 9종의 프라이머에서 조류인플루엔자 바이러스 아형 특이적인 증폭 양상을 확인하였음
- 해당 프라이머들의 타겟 증폭 유무 및 특이도는 아래 표와 같음 (표 16)

표 16. LAMP 프라이머 타겟 및 검증 유무

Target	Primer name	Amplification	Specificity
MP	MP-1	Yes	Yes
H1	H1-4	Yes	Yes
H3	H3-2	Yes	Yes
H4	H4-1	Yes	No
H4	H4-2	Yes	Yes
H4	H4-3	Yes	Yes
H5	H5-2	Partially	-
H5	H5-4	Yes	Yes
H5	H5-5	Partially	-
H6	H6-1	Yes	Yes
H9	H9-3	Yes	Yes
N6	N6-3	Yes	Yes

- 설계한 프라이머의 서열 정보 예시는 아래 표와 같음 (표 17)

표 17. LAMP 프라이머 설계 예

Target	Primer	Sequence
MP	F3	GCATCGGTCTCACAGACAG
	B3	ACTGGAGCTAGGGTGAGTT
	FIP	CAGCCATCTGCTCCATAGCCTTTTTTCCACCAACCCACTAATCAGG
	BIP	CAGCGGAAGCCATGGAGGTTTTTCCAATGGTCCTCATCGCC
	LP	GGCCAGCACCATTCTGTTT
	LB	AGGCTAGGCAGATGGTGC
H5	F3	CCACAATATACACCCTCTCAC
	B3	CTTTGTCTGCAGCGTAYC
	FIP	TCTTAGAGGACTATTTCTGAGTCCATTTTGGGAATGCCCAAATACG
	BIP	GRGCTATAGCAGGSTTTATAGAGGTTTTGCTCATTGCTATGGTGGTAY
	LP	GTCGCAAGGACTAATTTGTTTGA
	LB	AGGATGGCAGGGAATGGTAG
H9	F3	GAGAATCCTGAAGACCGAT
	B3	CCCTCTACCTGATGTAGCA
	FIP	GTGGAATGGCAATGTCGTATTCAAATTTTTAAATAGTGGCAACTGCG
	BIP	AGCAAGTATGCATTTGGGAACTTTTGCACATTTCTTAGACCAACT
	LP	CCTTTCTCAGTTTGGCACTG
	LB	GTTGGAGTGAAGAGTCTCAAACCTGG
N6	F3	CCAGATCAGGSTACGAAAT
	B3	ACYACTCTCYTTGGGTCTC
	FIP	GGTTGTTGACAATTATCTGGTRTGATTTTTTAAARGTCCCAAATGCAGAA
	BIP	AACTGGTCGGGATACTCAGGTTTTAGYTCCACATAAAAAACAAGGATTG
	LP	TGGCCCTGATTGGGTATC
	LB	TGGGCAAACAAAGAGTGCTT

다. 조류인플루엔자 바이러스 아형 클로닝 벡터 구축

- 설계한 LAMP 프라이머의 검증을 위해 조류인플루엔자 바이러스 아형의 분절 염기서열을 포함하는 클로닝 벡터를 구축하였음
- 클로닝 벡터는 2,221bp로 구성되며 M13_F와 M13_R의 프라이밍 사이트 및 ampicillin 저항성을 가지고 있음. 해당 벡터의 구성은 아래 그림과 같음 (그림 85)

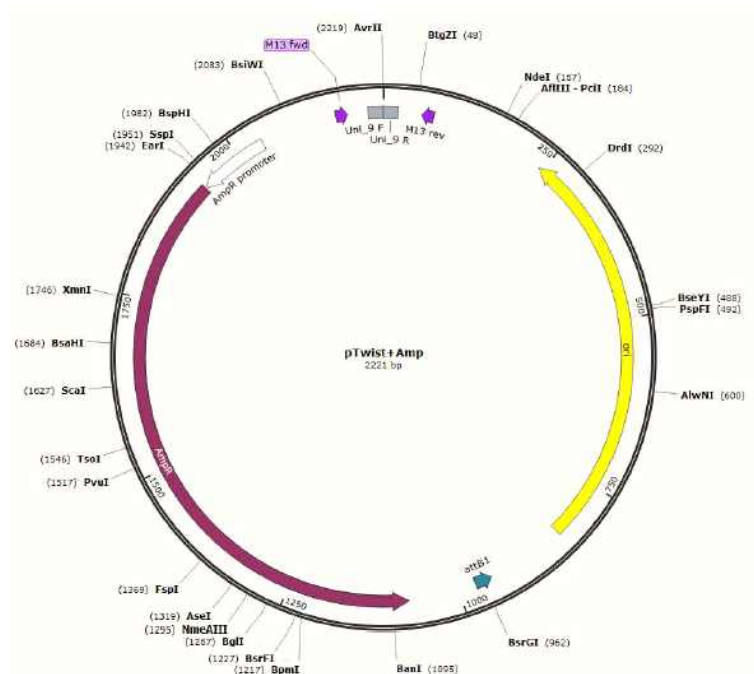
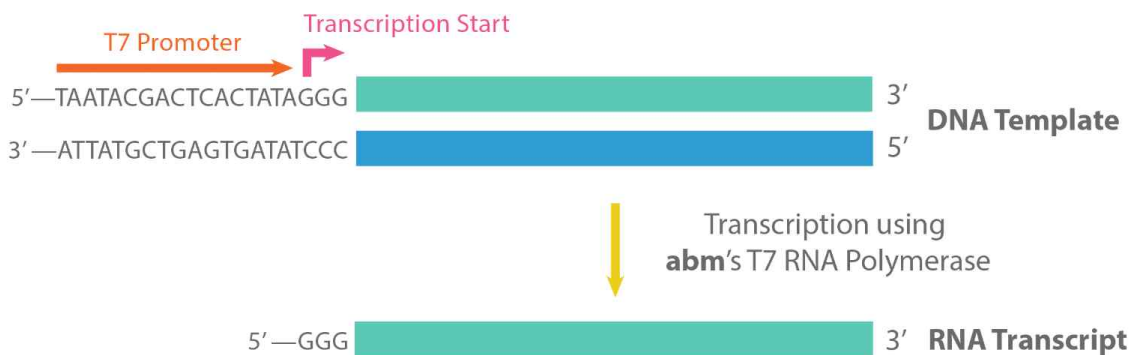


그림 85. 조류인플루엔자 아형 클로닝 벡터

- 특히 조류인플루엔자 바이러스 아형의 염기서열 5' flank에 T7 promoter 염기서열 (TAATACGACTCACTATAGGG)을 추가하여 클로닝 벡터에서 조류인플루엔자 바이러스의 RNA를 간편하게 얻을 수 있도록 하였음. 아래 그림은 T7 promoter를 이용한 *in vitro* transcription의 모식도를 나타내고 있음 (그림 86)



The run-off transcript is based on the top strand sequence

그림 86. T7 promoter를 이용한 viral RNA template 제작

- 본 연구개발 과제를 통해 총 4종의 조류인플루엔자 바이러스 아형의 염기서열을 포함하는 클로닝 벡터를 구축하였음 (표 18)

표 18. MP, H5, H9, N1의 클로닝벡터 구축 현황

No.	Name	Insert length	Construct length	Yield (ng)
1	H9_EPI341922	1703	3924	152
2	N1_EPI221746	1369	3590	2000
3	H5_EPI573199	1747	3968	2000
4	MP_EPI682981	1021	3242	558

- 클로닝 벡터의 수율을 높이기 위해 제작한 클로닝 벡터를 heat shock을 통해 competent cell에 넣어주는 transformation을 수행하였음 (그림 87)

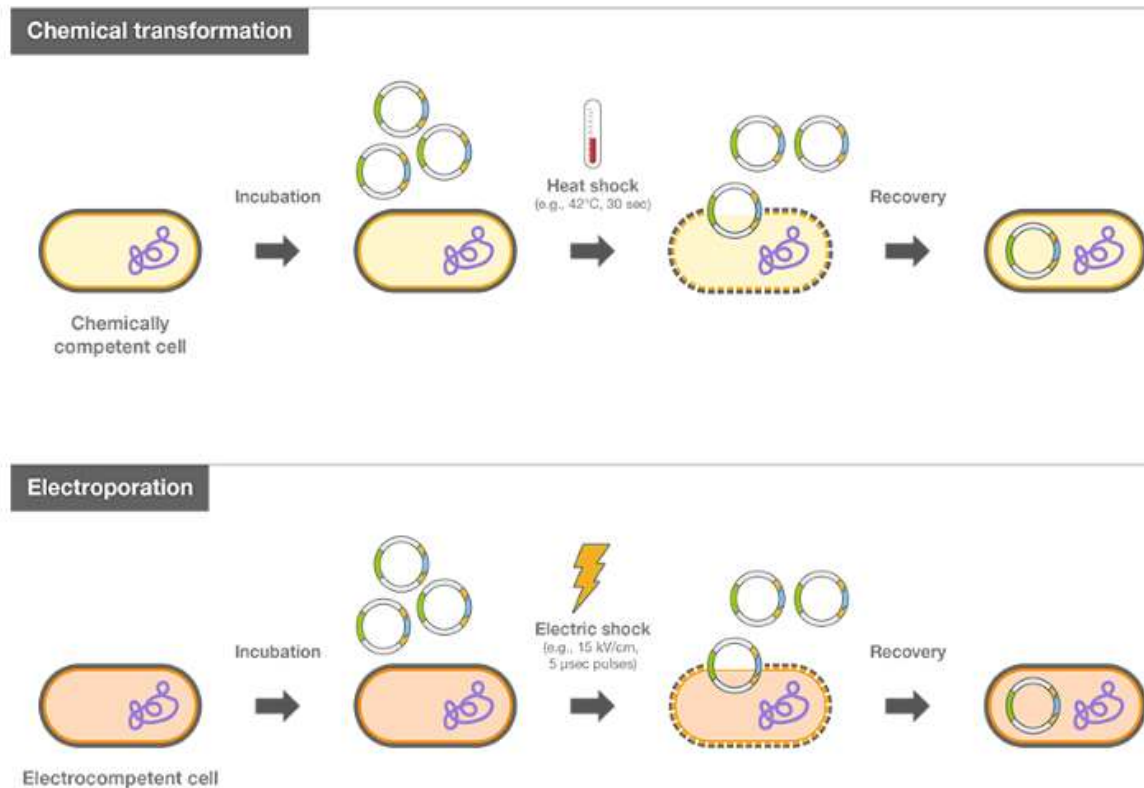


그림 87. Competent cell을 이용한 transformation 모식도
(출처: ThermoFisher Scientific)

- Transformation이 된 competent cell을 액체 배지에서 1시간 incubation 한 뒤, 고체배지에 spreading하여 colony 형성을 확인하였음 (그림 88)

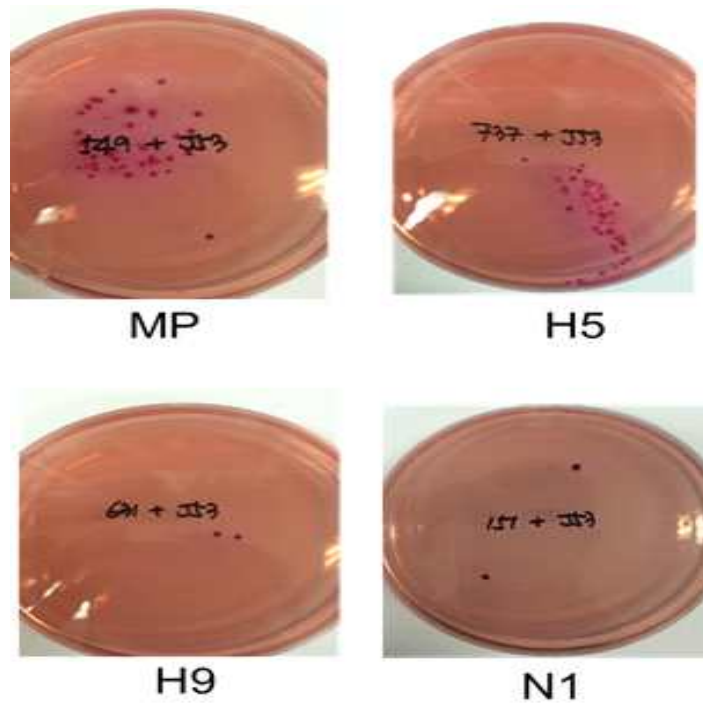


그림 88. 선택배지 plate에 형성된 colony

- 각각의 sample 별로 colony를 딴 뒤, 액체배지에 seeding하여 competent cell의 수율을 높임
- Plasmid는 Promega사의 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system을 이용하여 추출하였음
- 수득한 plasmid를 M13 primer로 PCR 진행 한 뒤, 전기영동을 통해 조류인플루엔자 아형의 염기서열 크기를 확인하였음 (그림 89)

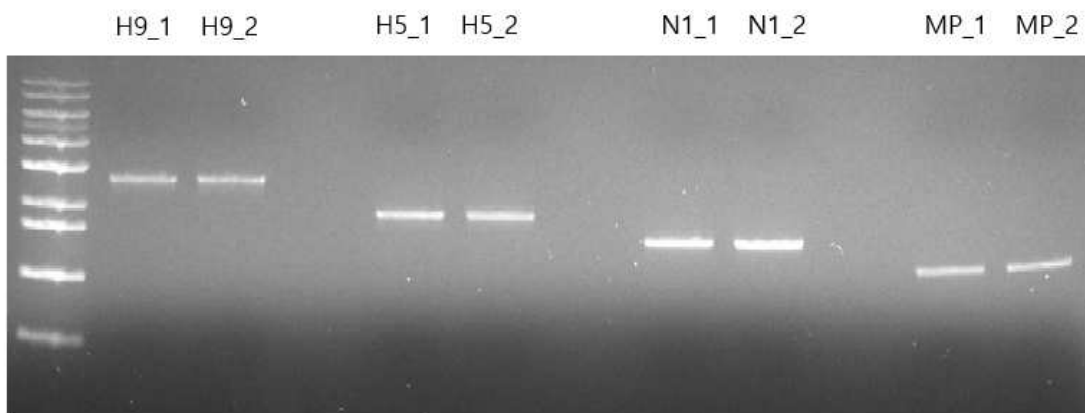


그림 89. 추출된 조류인플루엔자 바이러스 크기 확인

- QIAquick Gel extraction kit를 이용하여 DNA purification을 진행한 뒤, nanodrop을 이용하여 농도를 확인하였음 (표 19)

표 19. DNA purification 후 조류인플루엔자 바이러스 아형 유전자의 농도 결과

No.	Sample name	Concentration(ng/ul)	total volume	Yield (ng)
1	H9_1	61.1	50	3,055
2	H9_2	59.7	50	2,985
3	H5_1	80	20	4,000
4	H5_2	71.2	20	3,560
5	N1_1	86	20	4,300
6	N1_2	82.2	20	4,110
7	MP_1	37.1	20	1,855
8	MP_2	38.2	20	1,910

- 추출된 DNA들은 Sanger 시퀀싱을 이용하여 전체 염기서열을 확인하였으며, 확인 결과 모든 클로닝 벡터는 각각의 조류인플루엔자 아형 염기서열을 정확하게 포함하고 있음을 확인함. 아래 그림은 H5-1 클로닝 벡터에서 추출된 DNA의 Sanger 시퀀싱 결과를 나타내고 있음 (그림 90)

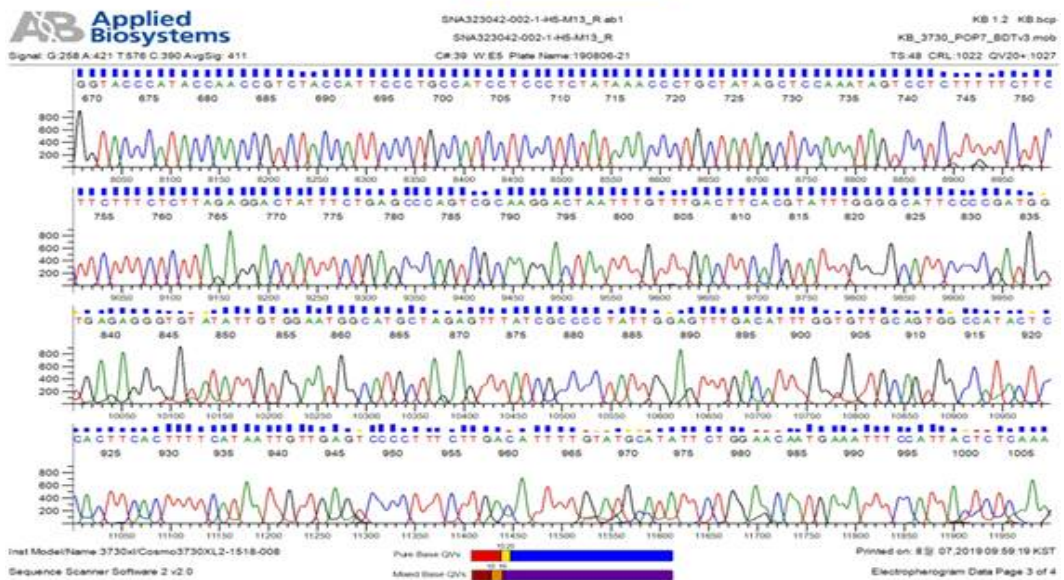
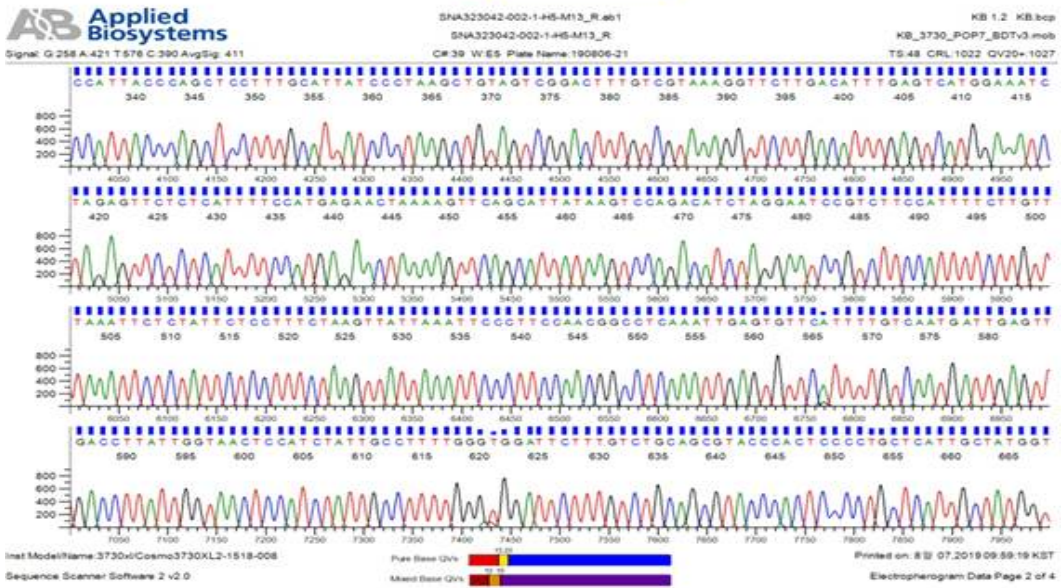
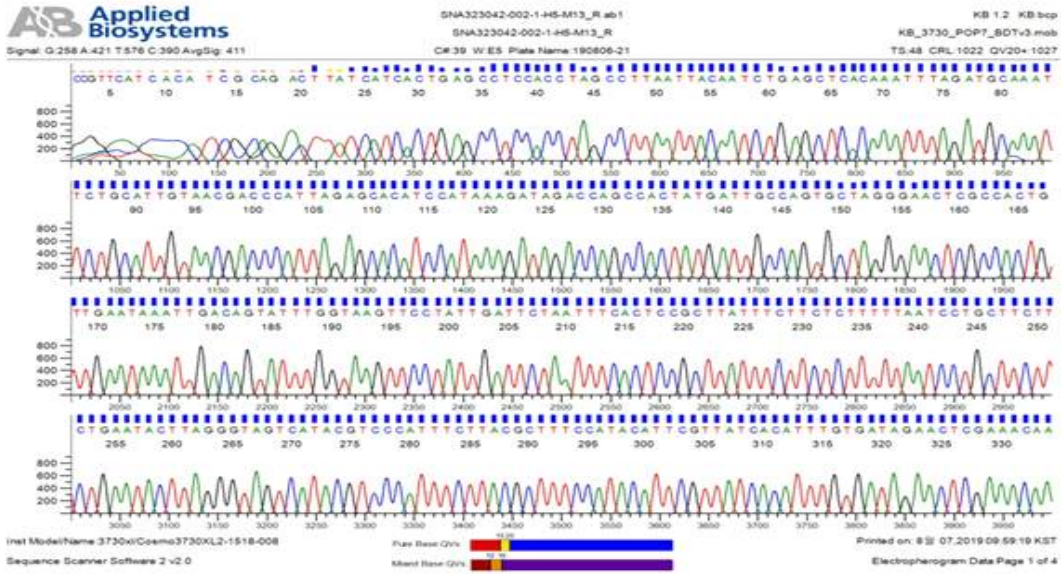


그림 90. H5-1 DNA에 대한 Sanger 시퀀싱 결과

- In vitro transcription은 T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA Production System을 이용하였으며, 본 과정을 통해 얻어진 viral RNA는 전기영동을 통해 정성평가를 수행하였음 (그림 91)



그림 91. 클로닝벡터에서 얻어진 조류인플루엔자 바이러스 RNA의 QC

라. LAMP 기반 조류인플루엔자 바이러스 검출기술 최적화

- 설계한 LAMP 프라이머들의 검증을 위해 LAMP 분석을 수행하였음
- LAMP 분석에 사용되는 시약의 조성은 아래 표와 같음 (표 20)

Table 20. LAMP 시약 조성

시약	Stock	Per reaction
Primer F3	-	0.2uM
Primer B3	-	0.2uM
Primer FIP	-	1.6uM
Primer BIP	-	1.6uM
Primer LF	-	0.8uM
Primer BF	-	0.8uM
Betaine	5M	0.4M
MgSO4	100mM	2-8mM
dNTPs	25mM each	1.4mM each
Isothermal amplification buffer (NEB)	10X	1X
Bst 2.0 DNA polymerase	8,000U	8U
AMV reverse transcriptase	10,000U	2U

- LAMP는 60℃에서 90분 이후 80℃에서 2분간 반응하였음
- 반응 산물은 전기영동법을 기본으로 하여 반응 유/무를 확인하였으며 일부 아형 타겟 프라이머에 대해서는 반응 부산물인 피로인산 마그네슘의 침전에 의한 육안적인 탁함과 FAM 형광을 측정하여 반응 유/무를 추가적으로 확인하였음
- 아래 그림은 N6 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머의 반응을 육안적 탁도 확인, 전기영동법, real-time PCR 방법으로 분석한 예를 나타내고 있음 (그림 92)

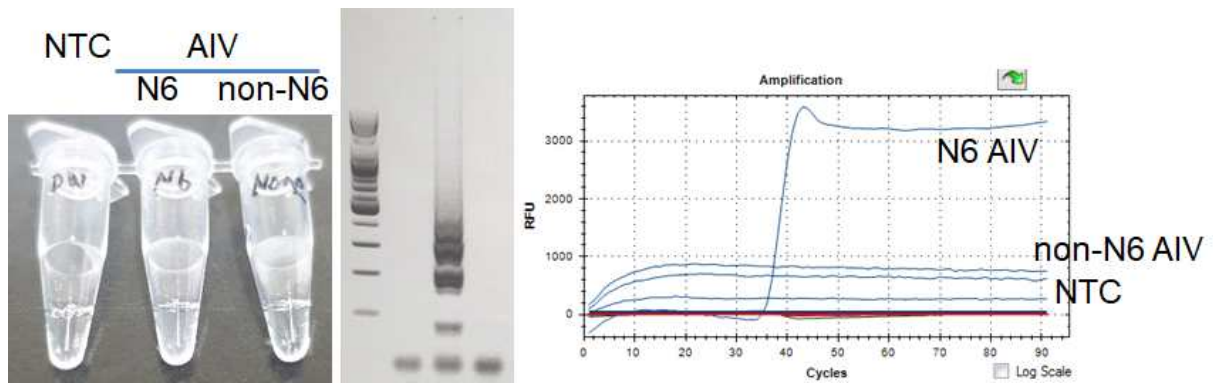


그림 92. N6 아형의 조류인플루엔자 바이러스 LAMP 분석 예시

- 그림 85에서 시료를 넣지않은 negative control (NTC)와 N6 아형이 아닌 조류인플루엔자 바이러스 (non-N6 AIV)를 대상으로 분석한 결과에서 반응산물이 탁하지 않고, 전기영동상 증폭 밴드가 확인되지 않으며 real-time상에서 형광 증폭이 검출되지 않았음
- 반면 N6 아형인 조류인플루엔자 바이러스로 LAMP 분석을 수행한 결과 NTC와 non-N6 AIV에 비해 탁함이 관찰되었고, 전기영동상의 증폭 밴드와 real-time PCR상의 형광 증폭이 검출됨을 확인하였음
- 조류인플루엔자 바이러스 H4 아형을 타겟으로하는 LAMP 프라이머 3종을 설계하였으며 이중 실험적으로 검증된 프라이머는 2종임 (H4-2, H4-3 프라이머)
 - H4 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머를 3종 제작하여 H4 아형의 fragment 염기 서열을 주형으로 반응을 수행한 결과 모든 프라이머 (H4-1, H4-2, H4-3)에서 증폭반응이 일어남을 확인하였음 (그림 93)

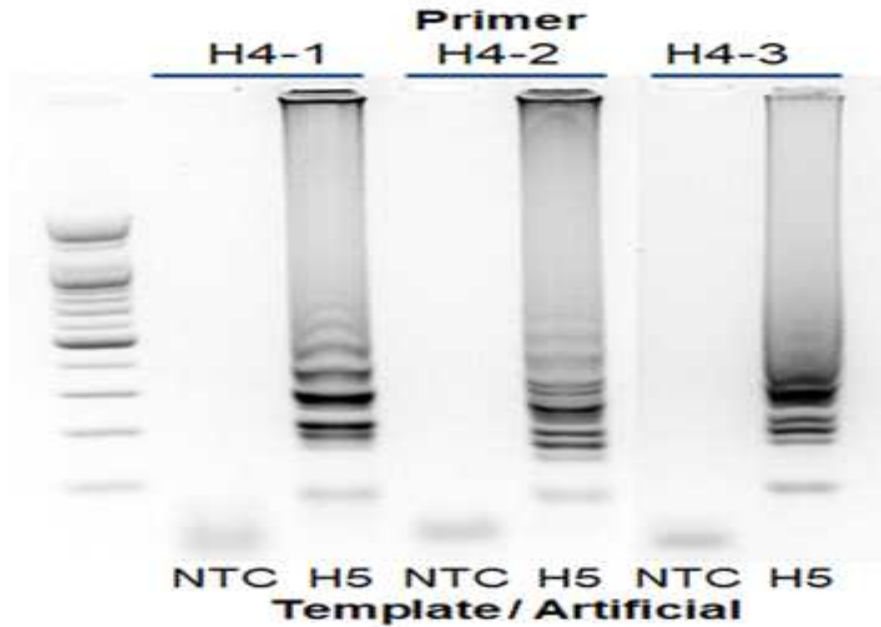


그림 93. H4 LAMP 프라이머의 증폭반응 결과

- 각 H4 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머의 특이도를 확인하기 위해 H4아형이 아닌 주형 2종 (H5, H9)과 주형이 들어있지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 분석을 수행하였음
- 분석 결과 H4-2와 H4-3 LAMP 프라이머가 H5, H9, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H4의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 94)

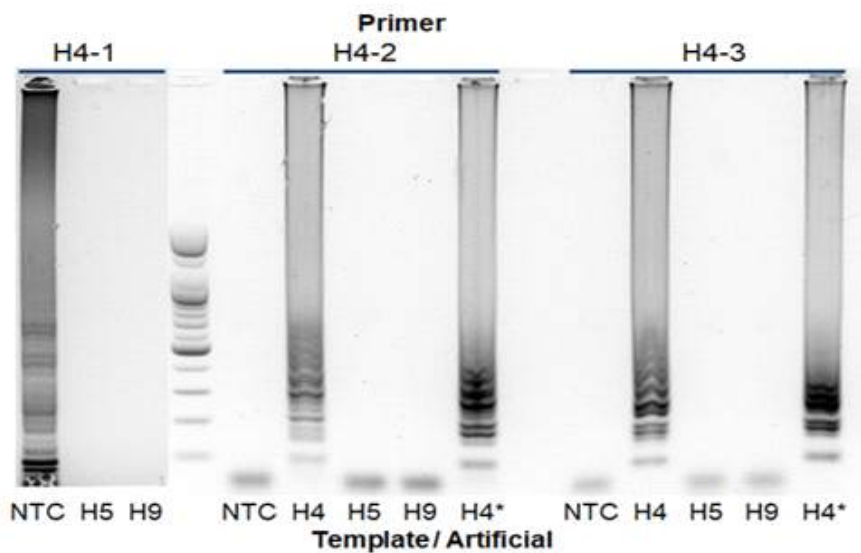


그림 94. H4 LAMP 프라이머의 특이도 평가 결과

- 추가로 H4-2 프라이머를 대상으로 피로인산 마그네슘의 최적 농도를 확인하기 위하여 마그네슘 농도를 각 2mM, 4mM, 6mM, 10mM로 LAMP 분석을 수행하였음
- 분석 결과 2mM의 마그네슘 농도에서는 모든 주형에서 증폭반응이 확인되지 않았으며, 6mM과 10mM의 마그네슘 농도에서는 H5 또는 H9의 아형에서 비특이적 반응이 일어남을 확인하였음
- 4mM의 마그네슘 농도에서만 H4 아형의 반응이 특이적으로 일어났기에 해당 LAMP 프라이머의 마그네슘 최적 농도를 4mM로 정하였음 (그림 95)

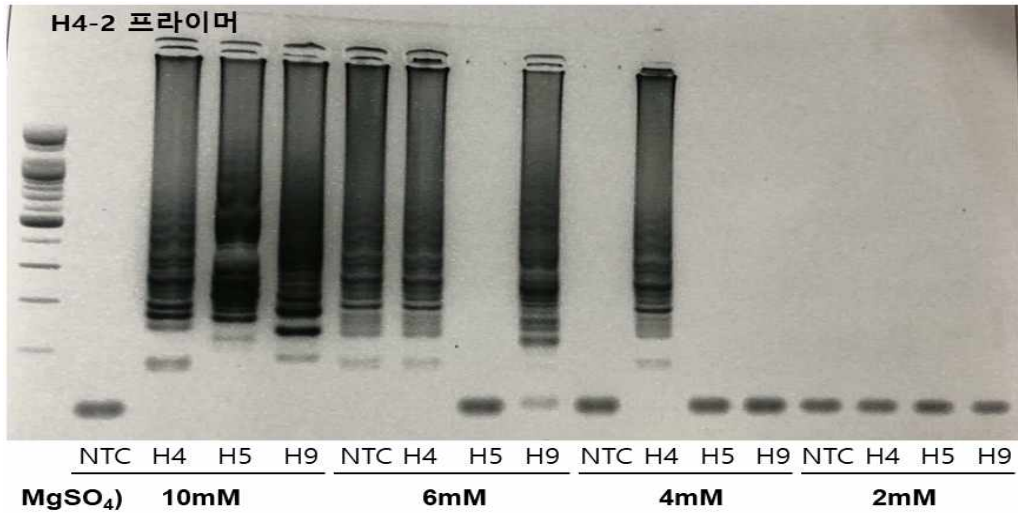


그림 95. H4-2 LAMP 프라이머의 최적 마그네슘 농도 설정

- 조류인플루엔자 바이러스 H5 아형을 타겟으로하는 LAMP 프라이머 3종을 설계하였으며 이중 실험적으로 검증된 프라이머는 1종임 (H5-4 프라이머)
- H5 아형을 타겟으로 하는 3종의 LAMP 프라이머를 설계하여 H5 아형의 fragment 염기서열을 주형으로 반응을 일으킨 결과, 모든 프라이머 (H5-2, H5-4, H5-5)에서 증폭반응이 일어남을 확인하였음 (그림 96)

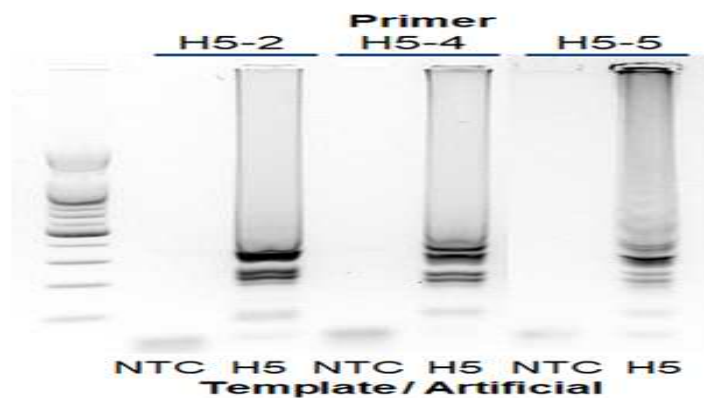


그림 96. H5 LAMP 프라이머의 증폭반응 결과

- H5 아형으로 확인된 야외검체들에서 동일 분석을 수행한 결과, H5-4 LAMP 프라이머에서 안정적인 증폭이 일어남을 확인하였음 (그림 97)

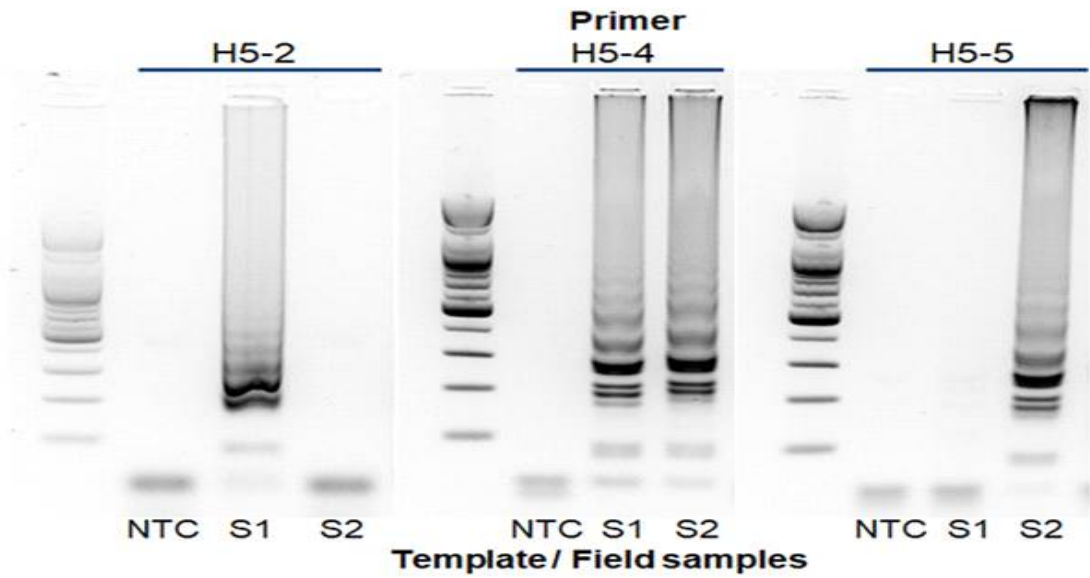


그림 97. H5 LAMP 프라이머의 야외검체 증폭반응 결과

- H5 아형의 시료에서 안정적인 증폭양상이 관찰된 H5-4 LAMP 프라이머의 특이도를 확인하기 위해 H5 아형이 아닌 주형 1종 (H9)과 주형이 들어있지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 분석을 수행하였음
- 분석 결과 H5-4 LAMP 프라이머가 H9, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H5의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 98)

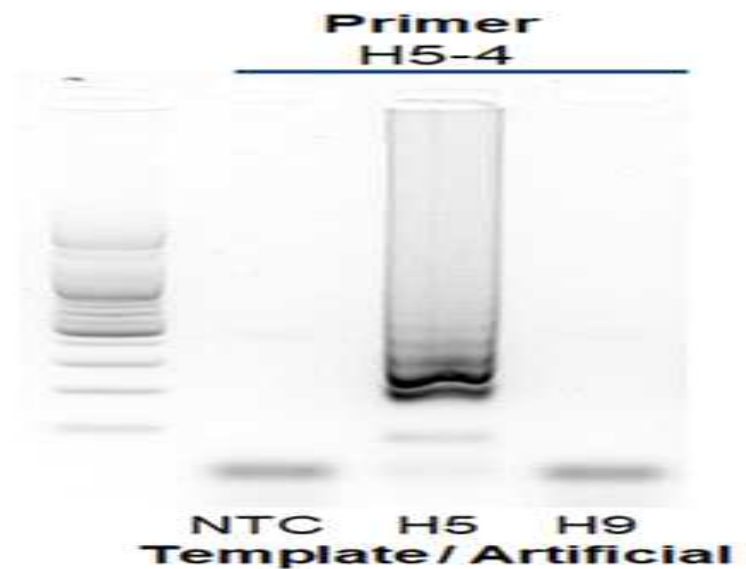


그림 98. H5 LAMP 프라이머의 특이도 평가 결과

- H5-4프라이머를 대상으로 최저검출한계 (limit of detection)을 확인하기 위하여 해당 LAMP 프라이머에 FAM 형광을 붙여 real-time PCR로 증폭량을 측정하였음
- H5 아형의 주형 양은 viral RNA 10만 copy에서부터 1만 copy, 1천 copy, 750 copy, 500 copy, 250 copy, 100 copy, 10 copy, negative control로 설정하였음
- 분석 결과 전기영동법에서는 750copy 이상의 주형에서 증폭반응이 지속적으로 확인되었으며, real-time 분석 결과도 전기영동법과 동일하게 750 copy 이상에서 증폭형광이 지속적으로 확인되었음 (그림 99). 따라서 H5 LAMP 프라이머의 최저검출한계는 750 copy임

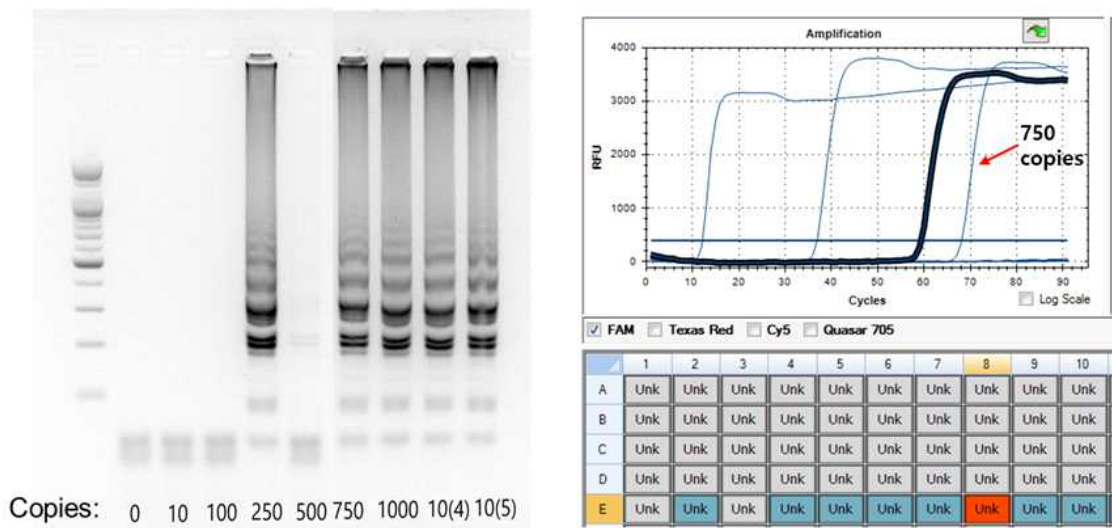


그림 99. H5 LAMP 프라이머의 최저검출한계

- 조류인플루엔자 바이러스 H1, H3, H6, H9 아형과 공통 구역인 MP를 각각 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 5종을 설계하였으며 모든 프라이머에서 실험적으로 검증되었음 (H1-4, H3-2, H6-1, H9-3, MP-1)
 - H1 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 (H1-4) 를 제작하여 H1 아형의 fragment 염기서열을 주형으로 반응을 수행한 결과 증폭반응이 일어남을 확인하였음
 - 또한 특이도를 확인하기 위해 H1 아형이 아닌 주형 2종 (H5, H9) 과 주형이 들어있지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 반응을 한 결과, H5, H9, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H1의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 100A)
 - H3 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 (H3-2) 를 제작하여 H3 아형의 fragment 염기서열을 주형으로 반응을 수행한 결과 증폭반응이 일어남을 확인하였음
 - 또한 특이도를 확인하기 위해 H3 아형이 아닌 주형 2종 (H5, H9) 과 주형이 들어있

- 지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 반응을 한 결과, H5, H9, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H3의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 100B)
- H6 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 (H6-1) 를 제작하여 H6 아형의 fragment 염기서열을 주형으로 반응을 수행한 결과 증폭반응이 일어남을 확인하였음
 - 또한 특이도를 확인하기 위해 H6 아형이 아닌 주형 2종 (H5, H9) 과 주형이 들어있지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 반응을 한 결과, H5, H9, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H6의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 100C)
 - H9 아형을 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 (H9-3) 를 제작하여 H1 아형의 fragment 염기서열을 주형으로 반응을 수행한 결과 증폭반응이 일어남을 확인하였음
 - 또한 특이도를 확인하기 위해 H9 아형이 아닌 주형 (H5) 과 주형이 들어있지 않는 negative control을 대상으로 LAMP 반응을 한 결과, H5, negative control에서는 증폭산물을 생성하지 않았으며 H9의 주형에서만 특이적으로 증폭산물을 생성함을 확인함 (그림 100D)
 - 조류인플루엔자 바이러스에서 공통적인 서열을 가지는 분절인 Matrix를 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 (MP-1)를 제작하여 HA의 아형이 서로 다른 야외검체들 (S1, S3) 에서 동일 분석을 주형으로 반응을 수행한 결과 증폭반응이 일어남을 확인하였음 (그림 100E)

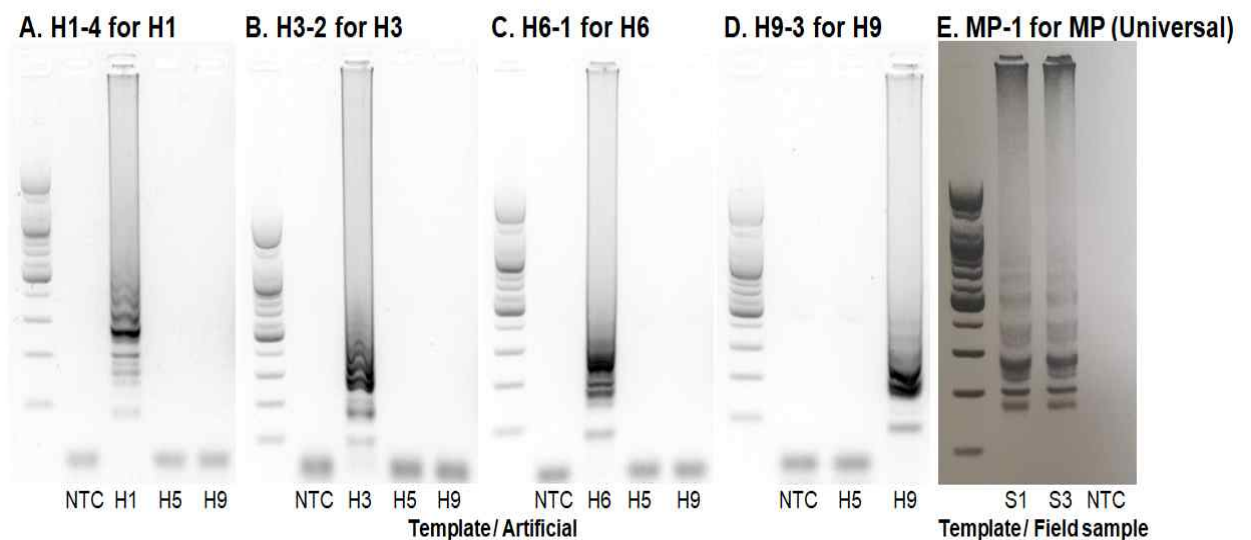


그림 100. H1, H3, H6, H9, MP LAMP 프라이머의 실험적 검증

마. RPA 기반 조류인플루엔자 바이러스 검출기술 개발

- RPA(Recombinase polymerase amplification)은 단일 튜브로 진행되는 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)에 대한 등온 대안 검출법임
- RPA 반응에는 역전사 효소(Reverse transcriptase enzyme)를 첨가함으로써 DNA뿐만 아니라 RNA도 검출 할 수 기법임
- 또한 이 기법은 등온법을 적용하는 것으로 약 30분내에 결과를 알 수 있으며 별도의 cDNA 합성 과정을 필요가 없다는 장점을 나타냄
- 따라서 야외에서 빠른 시간 내에 조류인플루엔자를 진단하는데 유용하게 사용할 수 있음
- 본 연구에서는 조류인플루엔자의 고병원성 H5N1의 H 유전자를 사용하였으며 (표 21) 반응 조성은 표 22와 같음

표 21. RPA 프라이머 설계 예

Target	Primer	Sequence(5'→3')
H5	Forward	AATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTA
	Reverse	ATACATTCATTATCACATTTATGATAGAACTCG
	Probe	GACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTA ACGGTTGTTTCGAG

표 22. RPA 시약 조성

시약	사용량	최종농도
2X reaction Buffer	25 ul	1X
100 mM dNTPs	2 ul	4 mM
10X buffer	5 ul	1X
20X buffer	2.5 ul	1X
50X buffer	1 ul	1X
Primer F(10 pmol/ul)	1 ul	0.2 pmol
Primer R(10 pmol/ul)	1 ul	0.2 pmol
Probe(10 pmol/ul)	0.5 ul	0.1 pmol
RNA	5 ul	2.5 ug
D.W	8.5 ul - 4.5 ul	
MgCL2	2.5 ul	
Total	50 ul	

- 조류 인플루엔자 H 유전자에 대한 RPA 실험에서 기본적인 시약 배율을 사용할 경우에는 그림 101 에서와 같이 시작부터 반응이 포화상태로 나타나 정확한 진단을 하기 어려운 문제가 있음



그림 101. 기본 조건에 대한 RPA 반응 결과

- 최적 반응 조건을 찾기 위한 실험에서는 그림 102에서 나타난 바와 같이 Primer와 Probe를 각각 10배 희석한 실험에서 최적의 결과를 찾을 수 있었음

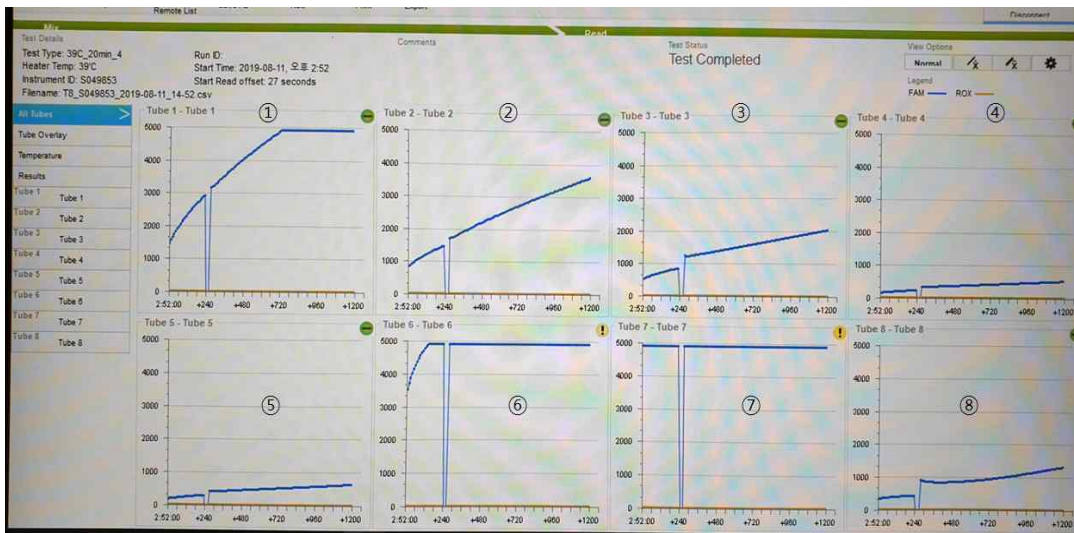


그림 102. 적정 조건 탐색을 위한 RPA 결과

- ① ② : Primer 100uM짜리 1 ul, Probe 10X 희석하여 0.5ul ③ ④ ⑤ :
 Primer 10uM짜리 1 ul, Probe 10X 희석하여 0.5ul ⑥ ⑦ : Primer 10uM짜리
 1 ul, Probe 원액 0.5ul ⑧ : Standard

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

□ 조류인플루엔자 바이러스 야외검체 수집

- 조류인플루엔자 바이러스 현장검체 확보를 위한 야외조류 검체 수집 100건 이상 실시
- 검체 수집은 전파경로 분석을 위해 4개 이상의 시/군에서 수집 실시
- 전파경로 및 전파 매개 분석을 위해 가금류 농장 주변 및 철새도래지(저수지) 주변에서 설치류 포획
- 야외검체 전처리 방법 확립

□ 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립

- 트랜스포존 기반의 NGS 실험 기반 확립
- PCR 기반의 NGS 실험 기반 확립
- NGS 데이터 생산조건 최적화 및 표준운영절차(SOP) 1건 개발
- NGS기반 조류인플루엔자 시퀀싱 데이터 분석 파이프라인 구축
- NGS기반 조류인플루엔자 시퀀싱 데이터 분석 소프트웨어 개발

□ 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석

- 야외검체에서 분리한 조류인플루엔자 바이러스 대상 NGS 데이터 생산
- 생산된 NGS 데이터 기반 아형, 고병원성 유무, 유전자 재편성 양상, 계통도 분석 수행
- 분석 결과 기반 조류인플루엔자 진화 특성 분석

□ 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석

- 전파경로 분석을 위해 4개 이상의 시/군에서 야외검체 수집
- 전파 매개 분석을 위해 가금류 농장 주변 및 철새도래지(저수지) 주변에서 설치류 포획
- 수집된 시료 대상 조류인플루엔자 항원/항체 검사
- 다지역 검사결과를 토대로 전파특성 및 경로 분석

□ 조류인플루엔자 백신접종 영향 분석

- 백신접종 모델 20례 이상 구축
- 백신접종 모델에 조류인플루엔자 바이러스 접종하여 영향 분석
- 백신접종에 의한 인체감염 위험성 제시
- 유전체 정보 기반 조류인플루엔자 상시감시체계 기술 개발
 - 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보에 대한 데이터베이스 1건 구축
- 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립
 - 등온증폭 기반의 조류인플루엔자 검출법 개발 1건 이상

제 2 절 목표 달성여부

- 조류인플루엔자 바이러스 야외검체 수집 (달성률: 100%)
 - 조류인플루엔자 바이러스 현장검체 확보를 위한 야외조류 검체 275건 수집 완료
 - 대상 조류인플루엔자 바이러스 검사를 실시하고 이를 부화란에 접종하여 22건의 조류 인플루엔자 바이러스 분리
 - 검체 수집은 전과경로 분석을 위해 7개 시/군에서 수집되었음
 - 전과 매개 분석을 위해 가금류 농장 주변 및 철새도래지(저수지) 주변에서 설치류 37례 포획
 - 야외검체 전처리 방법 확립
- 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립 (달성률: 100%)
 - 트랜스포존 기반의 NGS 실험 기반을 확립하고 이에 대한 SOP 1건 개발
 - PCR 기반의 NGS 실험 기반 확립하고 이에 대한 SOP 1건 개발
 - NGS기반 조류인플루엔자 시퀀싱 데이터 전처리, 리드 매핑, de novo assembly, 변이 검출, 아형판정, 계통분석의 최적화 분석 조건 확립
 - NGS기반 조류인플루엔자 시퀀싱 데이터 분석 파이프라인 구축
 - 시퀀싱 장비 연동 가능한 바이러스 아형결정 시스템 개발
 - NGS기반 조류인플루엔자 시퀀싱 데이터 분석 소프트웨어 1건 개발
 - 개발 소프트웨어 관련 논문 1건 게재
- 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석 (달성률: 100%)
 - 야외검체에서 분리한 조류인플루엔자 바이러스 대상 NGS 데이터 33건 생산

- 생산된 NGS 데이터 기반 아형, 고병원성 유무, 유전자 재편성 양상, 계통도 분석 결과 도출
- H5N6 바이러스 대상 3개년도 (2017-2019) NGS 분석을 통한 유전적 진화 특성 규명
- 고병원성 H5N6의 국내 토착화 가능성 제시
- H5N6/H5N3 바이러스 대상 NGS분석을 통한 분자적 특성 및 계통 규명
- 생산된 NGS 데이터에 대한 유전자원 및 원자료 108건 기탁 (NCBI 96건, 국가생명연구자원정보센터 12건)
- 관련결과 논문 투고 2건

□ 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석 (달성률: 100%)

- 전파경로 분석을 위해 7개 시/군에서 275건의 야외검체 수집
- 가금류 농장 주변 및 철새도래지(저수지) 주변에서 설치류 37례 포획
- 수집된 시료 대상 조류인플루엔자 항원/항체 및 분자 검사 결과 도출
- H5N6의 국내 토착화 가능성 제시
- 전파특성과 경로 분석하여 야생쥐가 조류인플루엔자 바이러스 전파 매개체임을 제시
- 관련 내용을 토대로 ‘조류인플루엔자 확산 및 전파 방지를 위한 대책수립건’의 정책건의 1건 시행

□ 조류인플루엔자 백신접종 영향 분석 (달성률: 100%)

- 닭을 대상으로 백신접종 모델 52례 구축
- 백신접종 모델에 바이러스 접종 후 항원, 항체 검사 및 혈구응집반응 시행
- 백신접종이 조류인플루엔자 바이러스 발생 예방에 효과적임을 제시
- 참여연구원에 대한 조류인플루엔자 항체검사를 실시
- 항체검사 결과를 토대로 백신접종의 인체영향을 평가
- 관련 내용을 토대로 ‘조류인플루엔자 백신접종을 통한 조류인플루엔자 발생 방지’의 정책건의 1건 시행

□ 유전체 정보 기반 조류인플루엔자 상시감시체계 기술 개발 (달성률: 100%)

- 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보에 대한 데이터베이스 1건 구축

□ 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 (달성률: 100%)

- 조류인플루엔자 바이러스의 4개 유전자 (MP, H5, H9, N1) 대상으로 클로닝벡터 구축

- LAMP 기반의 조류인플루엔자 바이러스 등온검출기술 확립
- 조류인플루엔자 MP, H1, H3, H4, H5, H6, H9, N6를 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 세트 12종 설계 및 검출 민감도 및 특이도 평가
- RPA 기반의 조류인플루엔자 바이러스 등온검출기술 확립
- 조류인플루엔자 H5를 타겟으로 하는 RPA 프라이머 세트 1종 설계

제 3 절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

- 하기의 표와 같이 당초 계획한 핵심 연구목표는 모두 달성 완료하였음

목표	세부목표	달성여부	달성도	비고
조류인플루엔자 바이러스 야외검체 수집	야외조류 검체수집 100건 이상	- 야외조류 검체 275건 수집 - AIV 22건 분리 - 설치류 37례 포획	100	당초 목표 초과달성 및 전파매개체 분석을 위한 설치류 검체를 추가로 수집함
	4개 이상의 시/군에서 수집	- 7개 시/군에서 수집		
	검체 전처리 방법 확립	- 검체 전처리 방법 확립		
조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립	트랜스포존 기반의 NGS 실험 기반을 확립	- 관련 SOP1건 개발	100	당초 목표 초과달성
	PCR 기반의 NGS 실험 기반 확립	- 관련 SOP1건 개발		
	AIV 시퀀싱 데이터 분석 파이프라인 구축	- NGS기반 AIV 데이터 분석 소프트웨어 1건 개발 - 관련 논문 1건 게재		
조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석	야외검체 AIV의 NGS 데이터 생산	- AIV의 NGS 데이터 생산 및 분석	100	-
	바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석	- AIV 유전 진화특성 규명 - AIV 분자특성 및 계통 규명 - 유전자원 108건 기탁 - 관련 논문 2건 투고		
조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석	조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석	- 국내 AIV 전파특성 규명 - AIV 전파 매개체 제시 - 관련 정책건의 1건 시행	100	당초 목표 초과달성
조류인플루엔자 백신접종 영향 분석	백신접종 모델 구축 20건 이상 및 분석	- 닭을 대상으로 백신접종 모델 52례 구축 - 백신접종의 인체영향 평가 - 관련 정책건의 1건 시행	100	당초 목표 초과달성
조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 및 상시 감시체계 개발	데이터베이스 구축	- AIV 유전정보 DB 1건 구축	100	당초 목표 초과달성
	조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립	- 조류인플루엔자 바이러스의 클로닝벡터 4종 구축 - LAMP 프라이머 세트 12종 개발 - RPA 프라이머 1종 개발		

- 다만 조류인플루엔자 바이러스의 유전체 자원 생산 건수는 당초 예상에 비해 적은수가 분석되었음. 이는 연구기간동안 조류인플루엔자가 주로 발생하는 겨울 시즌이 1번 (2018-2019)밖에 포함되지 않았으며, 이 시기에 고병원성 조류인플루엔자 발병이 없었기에 야외검체 바이러스주 확보가 불가항력적으로 불가능함에 기인함
- 따라서 성과지표 중 학술성과(논문) 부분의 당초 계획 (SCI급 1편, 비SCI급 2편)을 과제수행기간 내에 달성하지 못하였음
- 이에 대한 차후 대책으로 2019-2020 및 2020-2021년 겨울 시즌까지 검체를 지속적으로 수집하여 데이터를 생산할 계획임
- 분석 결과는 논문으로 발표하고 원자료는 국가생명연구자원정보센터에 기탁할 예정임
- 위의 과정을 통해 과제 종료 6개월 이내에 당초의 학술성과 목표를 달성할 계획이며 이미 비SCI논문 1건의 게재승인 및 SCI급 2편의 논문을 투고한 상태임
- 또한 학술성과 부족분을 보충하고 실제 조류인플루엔자 바이러스의 방역에 쓰일 수 있는 기술을 개발하고자, 당초 연구계획에 포함되지 않은 조류인플루엔자 바이러스 등온증폭 검출법을 개발하였음
- 개발된 검사법은 실험실 내에서 AIV 검출의 민감도 및 특이도가 검증되었으며, 추후 야외 현장에서 사용 가능한 포터블 등온증폭 기기와 연계하여 현장형 등온증폭 검사법 개발을 진행하고자 함
- 현재의 조류인플루엔자 확진은 모두 실험실 내에서 이루어지며 검체 수집현장에서 실험실로 검체 운반 과정상에 바이러스가 확산될 우려가 있음을 고려했을 때, 이와같은 현장형 등온증폭 검사법이 개발된다면 조류인플루엔자 예방 및 조기진단, 확산방지에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단하며, 이러한 부분에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료됨
- 조류인플루엔자 바이러스의 인체에 감염여부를 검사하기 위해서는 정부자금을 더 투입하여, 장기간에 걸쳐 전국의 양계축산인을 대상으로 시험하는게 유의성 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료됨

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

- 조류인플루엔자의 예방, 조기진단, 확산방지, 모니터링등에 활용
- NGS기반 정밀검사를 통해 규명한 조류인플루엔자의 유래를 바탕으로 백신 개발에 활용
- 야생조류에 의한 바이러스의 전파 여부 규명에 활용
- 구축한 유전자 데이터베이스를 통해 가금류의 고병원성 조류인플루엔자 발생 대응 및 관리대책 수립의 과학적 근거 제공
- 유전자 빅데이터 분석 기반 조류인플루엔자 바이러스 발생 상시 감시체계 시스템 제공
- 조류인플루엔자 바이러스의 상시 감시체계 시스템 제공
- 인수공통감염병인 조류인플루엔자 바이러스의 유전체 분석 기술 발전
- 구축한 조류인플루엔자 유전자 데이터베이스를 통한 관련분야 지식의 증진에 기여
- NCBI에 유전자 데이터 구축이 잘 되어 있기에 이를 연동한 빅데이터 구축에 기여
- 연구 수행 중 다양한 분석알고리즘의 개발 및 적용이 이루어지며 이는 다른 많은 질병연구 분야에서 활용될 수 있음. 특히 개발된 프로그램이 실제 인플루엔자 바이러스를 모니터링하고 변이를 예측할 수 있는 빅데이터로 활용할 수 있는 연구를 제안하고자 함
- 조류인플루엔자 바이러스의 정밀검사를 통한 조속한 초동대처로 농가 피해의 경제적 비용 감소
- 조류인플루엔자 바이러스의 정밀검사를 통한 조속한 초동대처로 사회적 비용 감소
- 특히, 본 과제에서 도출된 LAMP 및 RPA 검사법은 현재 특허출원을 준비중이며 이를 바탕으로 민감한 진단기술이 확보되면 이를 통한 부가가치 창출이 가능함
- 또한 LAMP 및 RPA 검사법을 검체 수집 현장에서 바로 적용할 수 있는 휴대용 등온증폭 기기 개발에 활용할 계획임
- 이는 현장 양계 산업 전문가 집단과의 협업이 요구되며, 인플루엔자 통합 연구자료로 활용되도록 할 계획임

붙임. 참고문헌

- Abente EJ, Kitikoon P, Lager KM, Gauger PC, Anderson TK, Vincent AL., A highly pathogenic avian-derived influenza virus H5N1 with 2009 pandemic H1N1 internal genes demonstrates increased replication and transmission in pigs. *J Gen Virol.* 2017 Jan;98(1):18-30.
- Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, Sorrell E M, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier R A., Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets., *Science.* 2012 Jun 22;336(6088):1534-41.
- Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, Maines TR, Zeng H, Pappas C, Sun X, Carney PJ, Villanueva JM, Stevens J, Katz JM, Tumpey TM., Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice., *Nature.* 2013 Sep 26;501(7468):556-9.
- Poddar SK., Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis., *J Virol Methods.* 2002 Jan;99(1-2):63-70.
- Group WOFHNEW. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* 2008 Jul;14(7):e1.
- Bi Y, Chen Q, Wang Q, et al. Genesis, Evolution and Prevalence of H5N6 Avian Influenza Viruses in China. *Cell Host Microbe.* 2016 Dec 14;20(6):810-821.
- Kwon JH, Lee DH, Swayne DE, et al. Reassortant Clade 2.3.4.4 Avian Influenza A(H5N6) Virus in a Wild Mandarin Duck, South Korea, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017 May;23(5):822-826.
- Lee EK, Lee YN, Kye SJ, et al. Characterization of a novel reassortant H5N6 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.4.4 in Korea, 2017. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Jun 13;7(1):103.
- Squires RB, Noronha J, Hunt V, et al. Influenza research database: an integrated bioinformatics resource for influenza research and surveillance. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012 Nov;6(6):404-16.
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547-1549.
- Si YJ, Lee IW, Kim EH, et al. Genetic characterisation of novel, highly pathogenic avian

influenza (HPAI) H5N6 viruses isolated in birds, South Korea, November 2016. *Euro Surveill.* 2017 Jan 5;22(1).

- Kim YI, Si YJ, Kwon HI, et al. Pathogenicity and genetic characterisation of a novel reassortant, highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6 virus isolated in Korea, 2017. *Euro Surveill.* 2018 Feb;23(7).
- Herfst S, Mok CKP, van den Brand JMA, et al. Human Clade 2.3.4.4 A/H5N6 Influenza Virus Lacks Mammalian Adaptation Markers and Does Not Transmit via the Airborne Route between Ferrets. *mSphere.* 2018 Jan–Feb;3(1).
- Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1–F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol.* 2006 Aug;80(16):7976–83.
- Hoffmann TW, Munier S, Larcher T, et al. Length variations in the NA stalk of an H7N1 influenza virus have opposite effects on viral excretion in chickens and ducks. *J Virol.* 2012 Jan;86(1):584–8.
- Das K, Ma LC, Xiao R, et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 2;105(35):13093–8.
- Soubies SM, Volmer C, Croville G, et al. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J Virol.* 2010 Jul;84(13):6733–47.
- Kim HK, Jeong DG, Yoon SW. Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza viruses in South Korea. *Clin Exp Vaccine Res.* 2017 Jul;6(2):95–103.
- Kang HM, Lee EK, Song BM, et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses among inoculated domestic and wild ducks, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):298–304.
- WHO Avian Influenza Weekly Update Number 629. Available online: https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai-20191213.pdf?sfvrsn=30d65594_44.
- Shelton H, Roberts KL, Molesti E, et al. Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. *J Gen Virol.* 2013 Jun;94(Pt 6):1220–9.
- Yamada S, Hatta M, Staker BL, et al. Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus. *PLoS Pathog.* 2010 Aug 5;6(8):e1001034.

- Adlhoch C, Gossner C, Koch G, et al. Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005. *Euro Surveill.* 2014 Dec 18;19(50):20996.
- Poen MJ, Bestebroer TM, Vuong O, et al. Local amplification of highly pathogenic avian influenza H5N8 viruses in wild birds in the Netherlands, 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2018 Jan;23(4).
- Chen P, Xie JF, Lin Q, et al. A study of the relationship between human infection with avian influenza a (H5N6) and environmental avian influenza viruses in Fujian, China. *BMC Infect Dis.* 2019 Sep 2;19(1):762.
- Global Consortium for HN, Related Influenza V. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science.* 2016 Oct 14;354(6309):213–217.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30:2114–20.
- Kim D, Langmead B, Salzberg S. HISAT2: graph-based alignment of next-generation sequencing reads to a population of genomes. 2017.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows - Wheeler transform. *bioinformatics.* 2009;25:1754–60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
- Danecek P, McCarthy SA. BCFtools/csq: haplotype-aware variant consequences. *Bioinformatics.* 2017;33:2037–9.
- Hunt M, Gall A, Ong SH, Brener J, Ferns B, Goulder P, et al. IVA: accurate de novo assembly of RNA virus genomes. *Bioinformatics.* 2015;31:2374–6.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:421.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자 정보 수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발 (영문) Monitoring the genetic mutations of AIV and their effect on human infection by NGS, and development of big-data utility system				
주관연구기관	가톨릭대학교 산학협력단		주 관 연 구	(소속) 암진화연구센터	
참 여 기 업			책 입 자	(성명) 정승현	
총연구개발비 (3500,000천원)	계	350,000천원	총 연 구 기 간	2018. 04. ~ 2019. 12. (1년 9개월)	
	정부출연 연구개발비	350,000천원		총 인 원	13 명
	기업부담금			내부인원	6 명
	연구기관부담금			외부인원	7 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>연구개발 목표: 인수공통전염병인 조류인플루엔자 바이러스(AIV)의 국내발생 및 토착화에 대비하기 위하여 전장유전체 분석을 통해 AIV 유전자 진화양상 및 국내 전파경로를 파악하고 백신접종이 인체감염에 미치는 영향을 분석하여 이를 통해 상시 모니터링 체계를 확립하고자 함</p> <p>주요 연구성과: AIV의 NGS 데이터 생산 표준운영지침(SOP) 개발, AIV NGS 데이터 분석 소프트웨어 개발, 국내 AIV의 유전적 진화 특성 및 분자적 특성 규명, 관련 유전자원 기탁, 관련 정책건의 시행, AIV의 유전정보 데이터베이스 구축, 국내 AIV의 전파경로 및 매개체 규명, 백신접종에 따른 인체영향 평가, 등온증폭 기반의 AIV 검출법 개발</p>					
<p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다지역 (국내 7개 시/군)에서 야외조류 검체 수집 (275건) - 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립 (관련 SOP 2건 및 소프트웨어 1건 개발, 유전자원 108건 기탁) - 국내 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 제시 (고병원성 AIV의 토착화 가능성) - 국내 조류인플루엔자 바이러스 아형별 분자적 특성 및 고병원성 유무, 재편성, 계통도 분석 - 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 제시 - 전파경로 분석을 통해 야생위가 조류인플루엔자 바이러스 전파 매개체임을 제시 - 조류인플루엔자 백신접종 모델 확립 및 백신접종 효능 규명 - 백신접종에 따른 인체영향 분석 - 조류인플루엔자 바이러스 유전자 정보에 대한 데이터베이스 구축 (1건) - 조류인플루엔자 바이러스의 클로닝백터 구축 (4종) - 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 (LAMP 검사법 12종, RPA 검사법 1종 개발) - LAMP 검사법의 검출 민감도 및 특이도 평가 					
<p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 조류인플루엔자의 예방, 조기진단, 확산방지, 모니터링에 활용 (관련 정책건의 2건) - NGS기반 정밀검사를 통해 규명한 조류인플루엔자의 유래를 바탕으로 백신 개발에 활용 - 구축한 유전자 데이터베이스를 통해 가금류의 고병원성 조류인플루엔자 발생 대응 및 관리대책 수립의 과학적 근거 제공 - 유전자 빅데이터 분석 기반 조류인플루엔자 바이러스 발생 상시 감시체계 시스템 제공 - 연구 개발에 적용한 다양한 분석알고리즘 및 소프트웨어를 다른 많은 질병연구 분야에서 활용 - LAMP 및 RPA 검사법을 검체수집 현장에서 바로 적용할 수 있는 휴대용 등온증폭기기 개발에 활용 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		318046-2	
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야	농식품기술개발사업			과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향 분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자 정보 수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발			과제유형	기초
연구기관	가톨릭대학교 산학협력단			연구책임자	정승현
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04.29.-2018.12.31	150,000		150,000
	2차연도	2019.01.01.-2019.12.31	200,000		200,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		350,000		350,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 02. 12

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
가톨릭대학교 산학협력단	연구조교수	정승현

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	정승현
----	-----

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 조류인플루엔자 바이러스의 전장 유전체 분석기반을 구축하였을 뿐 아니라, 실제 방역에 활용할 수 있는 검사법 개발까지 완료하였음
- 백신접종 동물모델을 구축하고 이를 바탕으로 인체영향을 평가하여 정책건의를 수행하였음
- 국내 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 토착화 가능성을 분자 유전적으로 규명하였음
- 국내 조류인플루엔자 바이러스의 전파경로를 분석하고 이에 대한 매개체를 제시하였음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- NGS 데이터 생산을 위한 표준운영지침 개발을 통해 조류인플루엔자 바이러스 정밀검사법 도입이 가속화 될 것으로 기대함
- 연구 과제의 결과를 바탕으로 2건의 정책건의를 진행하였으며, 이를 통해 국내 조류인플루엔자 바이러스의 효과적 예방 및 방역 전략을 수립할 것으로 기대함
- 개발한 등온증폭 기반의 조류인플루엔자 검사법은 기존의 현장진단법인 래피트키트에 비해 높은 민감도를 나타내기에 이를 대체할 수 있을 것으로 기대함. 특히, 등온증폭 검사법 관련 특허 출원을 준비중이기에 이를 통한 부가가치 창출이 가능할 것으로 기대함
- 조류인플루엔자 바이러스의 검사법 개발로 조기진단이 가능해 지기에 조속한 초기대처로 조류인플루엔자 발생시 농가의 경제적 피해 및 사회적 비용 감소를 기대함

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- NGS 데이터 생산을 위한 표준운영지침 2건을 개발하였으며, 이는 향후 NGS기반의 조류인플루엔자 바이러스 정밀검사법 개발에 활용 가능함
- 구축한 유전자 데이터베이스를 통해 가금류의 조류인플루엔자 발생 대응 및 관리대책 수립의 과학적 근거를 제공하며, 추후 현장진단 등온증폭기와 연계하여 데이터베이스 활용 가능함
- 개발한 조류인플루엔자 바이러스 NGS 분석 알고리즘 및 소프트웨어는 다른 여러 바이러스 검출 및 분석에 활용 가능함
- NGS기반 정밀검사를 통해 규명한 조류인플루엔자의 유래를 바탕으로 백신 개발에 활용
- 구축한 유전자 데이터베이스를 통한 관련분야 지식의 증진에 활용 가능함
- 조류인플루엔자 바이러스의 상시 감시체계 시스템 구축에 활용 가능함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 과제 목표 달성을 위해 계획서에 따라 충실하게 이행하였음
- 조류인플루엔자 바이러스의 유전체 자원을 생산하여 유전적 진화과정을 규명하였고, 다지역 시료 채취 및 분석을 통해 전과경로 및 매개체를 제시하였음. 또한 백신접종 모델 구축 및 이에따른 인체 영향을 평가하였음
- 이 과정에서 정립된 실험 및 분석 방법들은 표준운영절차 및 프로그램 개발을 통해 타 연구에 활용할 수 있도록 하였음
- 이를 통해 대부분의 주요 목표를 초과하여 달성하였음
- 과제 계획서 상 제시되지 않았던 등온증폭 기반 검사법을 추가적으로 개발하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- 생산된 조류인플루엔자 유전자원 및 원자료 108건을 기탁하였음 (NCBI 96건, 국가생명연구 자원정보센터 12건)
- 과제 수행에서 도출된 결과를 바탕으로 2건의 정책건의를 시행하였음
- 조류인플루엔자 바이러스 NGS 데이터 생산에 대한 표준운영절차 2건을 개발하였음
- NGS기반 조류인플루엔자 바이러스 데이터 분석 파이프라인 및 소프트웨어를 1건 개발하였으며 논문 1건을 게재하였음
- 국내외 학술대회에서 2건을 발표하였음
- 추가적으로, 고병원성 H5N6 분석 결과 및 저병원성 H5N3 분석 결과를 국제학술지에 투고 하였으며, 과제 종료 후 6개월 이내에 출간될 것으로 판단함
- 과제 계획서 상 제시되지 않았던 등온증폭 기반 검사법을 추가적으로 개발하여 현재 특허 출원을 준비중임

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
조류인플루엔자 바이러스 야외검체 수집	10	100	- 7개 시/군에서 야외조류 검체 275건 수집 - 설치류 37례 포획 - 검체 전처리 방법 확립
조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립	15	100	- 트랜스포존 기반 NGS 실험법 SOP 1건 개발 - PCR 기반 NGS 실험법 SOP 1건 개발 - NGS 데이터 분석 소프트웨어 1건 개발 - 관련논문 1건 게재
조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석	15	100	- NGS 데이터 생산 및 분석 - AIV 유전적 진화 특성 규명 - AIV 분자적 특성 및 계통도 규명 - 유전자원 108건 기탁 - 관련 논문 2건 투고
조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석	15	100	- 국내 AIV 전파특성 규명 - AIV 전파 매개체 제시 - 관련 정책건의 1건 시행
조류인플루엔자 백신접종 영향 분석	15	100	- 닭을 대상으로 백신접종 모델 52례 구축 - 백신접종의 인체영향 평가 - 관련 정책건의 1건 시행
조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 및 상시 감시체계 개발	30	100	- AIV 유전정보 데이터베이스 1건 구축 - AIV 클로닝백터 4종 구축 - LAMP 기반 프라이머 세트 12종 개발 - RPA기반 프라이머 세트 1종 개발
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 조류인플루엔자 바이러스의 전장 유전체 분석기반을 구축하였을 뿐 아니라, 실제 방역에 활용할 수 있는 검사법 개발까지 완료하였음
- 국내 고병원성 조류인플루엔자 바이러스의 토착화 가능성을 분자 유전적으로 규명하였으며 전파경로 및 이에 대한 매개체를 제시하여 조류인플루엔자 확산 및 전파 방지를 위한 대책수립건의 정책건의를 수행하였음
- 백신접종 동물모델을 구축하고 이를 바탕으로 인체영향을 평가하여 조류인플루엔자 백신접종을 통한 조류인플루엔자 발생 방지건의 정책건의를 수행하였음
- 본 과제를 통해 도출된 결과물들을 바탕으로 향후 조류인플루엔자 바이러스 상시 모니터링 체계 구축을 위한 초석을 마련하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 당초 계획한 핵심 연구목표는 모두 달성 완료하였으나, AIV 유전체 자원 생산 건수는 당초 예상에 비해 적은수가 분석되었음. 이는 연구기간동안 AIV가 주로 발생하는 겨울 시즌이 1번밖에 포함되지 않았으며, 이 시기에 고병원성 조류인플루엔자 발병이 없었기에 야외검체 바이러스주 확보가 불가항력적으로 불가능함에 기인함
- 따라서 성과지표 중 학술성과(논문) 부분의 당초 계획 (SCI급 1편, 비SCI급 2편)을 과제 수행기간 내에 달성하지 못하였음. 이에 대한 차후 대책으로 검체를 지속적으로 수집하여 데이터를 생산/분석하고 과제 종료 6개월 이내에 당초의 학술성과 목표를 달성할 계획임. 이미 비SCI논문 1건의 게재승인 (3월 출간) 및 SCI급 2편의 논문을 투고한 것에 대해 평가시 고려 필요함
- 또한 학술성과 부족분을 보충하고 실제 조류인플루엔자 바이러스의 방역에 쓰일 수 있는 기술을 개발하고자, 당초 연구계획에 포함되지 않은 조류인플루엔자 바이러스 등온증폭 검출법을 개발한 점에 대해 평가시 고려 필요함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 개발된 등온증폭 기반 검사법은 실험실 내에서 AIV 검출의 민감도 및 특이도가 검증되었으며, 추후 야외 현장에서 사용 가능한 포터블 등온증폭 기기와 연계하여 현장형 등온증폭 검사법 개발이 기대됨
- 현재의 조류인플루엔자 확진은 모두 실험실 내에서 이루어지며 검체 수집현장에서 실험실로 검체 운반 과정상에 바이러스가 확산될 우려가 있음을 고려했을 때, 이와같은 현장형 등온증폭 검사법이 개발된다면 조류인플루엔자 예방 및 조기진단, 확산방지에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단하며, 이러한 부분에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료됨
- 구축한 AIV 데이터베이스는 향후 현장형 등온증폭기와 연동하여 현장에서의 진단 결과가 실시간으로 중앙 데이터베이스에 저장/관리될 수 있도록 하여 상시 모니터링 시스템 구축에 활용이 기대됨

IV. 보안성 검토

- 국가 공익사업으로 보안등급 일반으로 분류함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 국가 공익사업으로 보안등급 일반으로 분류함

2. 연구기관 자체의 검토결과

- 국가 공익사업으로 보안등급 일반으로 분류함

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농식품기술개발사업	
연구과제명	인수공통전염병인 AI 백신접종이 인체감염에 미치는 영향분석, AI 바이러스 변이성 상시 모니터링을 위한 유전자 정보 수집 방법 및 빅데이터 활용 시스템 개발			
주관연구기관	가톨릭대학교 산학협력단	주관연구책임자	정승현	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	350,000천원			350,000천원
연구개발기간	2018. 04. 29. ~ 2019. 12. 31.			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(개발) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 조류인플루엔자 바이러스 야외검체 수집	- 7개 시/군에서 야외조류 검체 275건 수집 - 설치류 37례 포획 - 검체 전처리 방법 확립
② 조류인플루엔자 바이러스의 NGS 데이터 생산 및 분석 조건 확립	- 트랜스포존 기반 NGS 실험법 SOP 1건 개발 - PCR 기반 NGS 실험법 SOP 1건 개발 - NGS 데이터 분석 소프트웨어 1건 개발 - 관련논문 1건 게재
③ 조류인플루엔자 바이러스 아형별 유전자 진화 특성 분석	- NGS 데이터 생산 및 분석 - AIV 유전적 진화 특성 규명 - AIV 분자적 특성 및 계통도 규명 - 유전자원 108건 기탁 - 관련 논문 2건 투고
④ 조류인플루엔자 바이러스 전파 특성 분석	- 국내 AIV 전파특성 규명 - AIV 전파 매개체 제시 - 관련 정책건의 1건 시행
⑤ 조류인플루엔자 백신접종 영향 분석	- 닭을 대상으로 백신접종 모델 52례 구축 - 백신접종의 인체영향 평가 - 관련 정책건의 1건 시행
⑥ 조류인플루엔자 바이러스의 현장진단 기술 확립 및 상시 감시체계 개발	- AIV 유전정보 데이터베이스 1건 구축 - AIV 클로닝백터 4종 구축 - LAMP 기반 프라이머 세트 12종 개발 - RPA기반 프라이머 세트 1종 개발

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	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		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치													10			40	50			
최종목표											1	2	1			1	1			
연구기간내 달성실적											0	0	2			2	108			
달성율(%)													100			100	100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	AIV NGS 데이터 생산 기술
②	AIV NGS 데이터 분석 기술
③	등온증폭기반 LAMP 진단 기술
④	등온증폭기반 RPA 진단 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					V			V		
②의 기술					V			V		
③의 기술		V				V	V	V		
④의 기술		V				V	V	V		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	향후 NGS기반의 조류인플루엔자 바이러스 정밀검사법 개발에 활용 기대
②의 기술	조류인플루엔자 바이러스 이외의 질환 분석에 활용 기대
③의 기술	야외 현장에서 사용 가능한 포터블 등온증폭 기기와 연계하여 현장형 등온증폭 검사법 개발이 기대
④의 기술	조류인플루엔자 예방 및 조기진단, 확산방지에 큰 기여

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치														10			40	50	
최종목표											1	2		1			1	1	
연간기간내 달성실적														2			2	108	
연구종료 후 성과창출 계획											1	2							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input 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 type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.