

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001475-01

보.안.과.제.(), 일.반.과.제.(O)

과.제.번.호. 110026-2

가축 질병 예찰 및 방역을 위한 휴대용 모니터링
진단시스템 개발 및 산업화

(Development and Industrialization of Portable
Monitoring Diagnostic System)

베트올(주)

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “가축 질병 예찰 및 방역을 위한 휴대용 모니터링 진단시스템 개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 30 일

주관연구기관명 : 베트올(주)

주관연구책임자 : 김정미

세부연구책임자 : 김정미

연 구 원 : 이헌식, 양미영, 최윤동, 이대은, 정태진, 배슬기, 김성래

협동연구기관명 : 비아이티밸류

협동연구책임자 : 조원창

연 구 원 : 조성화, 김용민, 이철한, 최정욱

협동연구기관명 : 농림수산검역검사본부 (구:국립수의과학검역원)

협동연구책임자 : 현방훈

연 구 원 : 김재조, 임성인, 한규하, 주수경, 최윤녀, 권명현, 이경우

요 약 문

I. 제 목

가축 질병 예찰 및 방역을 위한 휴대용 모니터링 진단시스템 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적

- 소바이러스설사병 (Bovine Viral Diarrhea:BVD) 신속진단키트 (Point of Care Test: POCT) 제품 개발 및 산업화
- 범용 휴대용 정량 진단시스템 개발 및 산업화

III. 연구개발 내용

- Lateral-flow immunoassay 기술을 이용한 소바이러스설사병 항원 신속진단키트 개발.
- 신속진단키트를 분석 하기위한 유비쿼터스 기반기술을 장착한 범용 휴대용 정량 분석 장치 개발.

IV. 연구개발 결과

- 소바이러스설사병 항원 신속진단 키트 개발
- 범용 휴대용 정량분석 장치 개발

V. 연구성과 활용 계획

- 현장에서 신속정확하게 질병 조기검진 및 제어시스템 분야에 활용
- 범용 휴대용 정량분석 장치를 사용하여 다양한 질병들에 대한 분석값을 데이터베이스로 구축하는데 활용
- 신시장 창출, 수입대체 효과 및 수출 증대효과 기대

SUMMARY

I. Title

Development and Industrialization of Portable Monitoring Diagnostic System

II. Objectives

- Development and industrialization of rapid and precise detection system for Bovine Viral Diarrhea (BVD)
- Development and industrialization of general-purpose portable monitoring diagnostic system

III. Point of research

- Development of BVD antigene rapid detection kit using lateral-flow immunoassay technique.
- Development of portable monitoring diagnostic system based on ubiquitous network technology for quantitative analysis of the lateral flow

IV. Results

- Construction of BVD antigen rapid detection kit
- Production of portable lateral flow reader equipment

V. Applications

- Application to rapid diagnostic tool and animal disease control system of point-of-care (POC)
- Application to create database with quantitative analysis measurement from variety animal disease using general-purpose portable monitoring diagnostic system
- New market presence, import substitution, and export increase

CONTENTS

| | |
|--|----|
| Document for submission | 1 |
| Summary (Korean) | 3 |
| Summary (English) | 4 |
| Contents (English) | 5 |
| Contents (Korean) | 9 |
| Chapter 1. Introduction | 12 |
| Section 1. Objectives of research and development | 12 |
| Section 2. Necessity of research and development | 12 |
| 1. Technical aspects | 12 |
| 2. Economic and industrial aspects | 15 |
| Chapter 2. Present view of technology in domestic and foreign countries | 18 |
| Chapter 3. Substances and Results of performed research and development | 20 |
| <1st detailed project report: 베타올(주)> | |
| Section 1. Production of antibody to detect BVDV | 20 |
| 1. Construction of monoclonal antibody against gp53 (E2) | 21 |
| 2. Construction of monoclonal antibody against inactivated BVDV | 22 |
| 3. Construction of polyclonal antibody against gp53 (E2) | 28 |
| 4. Construction of polyclonal antibody against inactivated BVDV | 32 |

| | |
|---|----|
| 5. Antibody purification by affinity chromatography | 34 |
| Section 2. Determination of the antibody concentration for test kit | 36 |
| 1. Determination of proper antibody concentration for test strip | 36 |
| 2. Determination of proper antibody concentration for colloidal gold conjugate | 40 |
| <2nd detailed project report: 비아이티벨류> | |
| Section 1. Development of E/S (Engineering Sample) System for Portable Quantitative Reader | 42 |
| 1. Exterior Design and Mock-up Construction | 43 |
| 2. Development of Optical System | 45 |
| 3. Development of Embedded PCB board | 47 |
| 4. Connection part for Bluetooth | 48 |
| Section 2. Development of commercial software for Portable Quantitative Reader | 49 |
| 1. Development of Test Process | 49 |
| 2. Software Configuration | 51 |
| 3. Development of Calibration Software | 52 |
| 4. Development of User Interface | 54 |
| 5. Development of PC Software | 57 |
| Section 3. Performance test of Portable Reader | 58 |
| 1. Accuracy measurement | 58 |
| 2. Dynamic range measurement | 60 |

| | |
|--|----|
| 3. Confirmation of Reproducibility | 60 |
| <3rd detailed project report: 농림수산검역검사본부> | |
| Section 1. Establishment of foundation to evaluate of Portable Monitoring Diagnostic System | 62 |
| 1. Secure evaluation basic- and reference-materials | 62 |
| 2. Production and confirmation of BVDV reference-material | 68 |
| Section 2. Testing for availability of BVDV rapid kit | 72 |
| 1. Testing for availability of BVDV rapid kit | 72 |
| 2. Quantitative analysis of BVDV rapid kit | 74 |
| 3. Testing for in vitro availability of BVDV rapid kit | 74 |
| Section 3. Test of Generality of Optical reader | 75 |
| 1. Quantitative analysis of FeLV (Feline Leukemia Virus) rapid kit depending on antigen titer | 75 |
| 2. Quantitative analysis of CRV (Canine Rota Virus) rapid kit depending on antigen titer | 77 |
| 3. Quantitative analysis of FPV (Feline Panleukopenia Virus) rapid kit depending on antigen titer | 78 |
| Chapter 4. Achievement and contribution | 81 |
| Section 1. Annual research goal and attainment upon evaluation points | 81 |
| Section 2. Contribution to the related fields | 82 |
| 1. Technical aspect | 82 |
| 2. Economic and industrial aspect | 83 |
| Chapter 5. Plans for the use of the results | 84 |

| | |
|---|----|
| 1. Merchandising and commercialization strategy | 84 |
| 2. Prototype development | 84 |
| 3. Patent application | 90 |
| Chapter 6. References | 92 |

목 차

| | |
|--|----|
| 제 출 문 | 1 |
| 요 약 문 | 3 |
| Summary | 4 |
| Contents (English) | 5 |
| Contents (Korean) | 9 |
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 12 |
| 제 1 절 연구개발의 목적 | 12 |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 | 12 |
| 1. 기술적 측면 | 12 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 15 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 18 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 20 |
| <제1세부과제: 베트올(주)> | |
| 제 1 절 BVD 진단을 위한 항체 원료 제조 | 20 |
| 1. BVDV strain간 gp5 (E2 단백질) 서열에 대한 항원성 부위 펩타이드 면역을 통한 단클론 항체 제작 | 21 |
| 2. 불활화 BVDV 면역을 통한 단클론 항체 제작 | 22 |
| 3. BVDV strain간 gp53 (E2 단백질) 서열에 대한 다클론 항체 제작 (pT3s) | 28 |
| 4. BVDV 불활화 백신에 대한 다클론 항체제작 | 32 |
| 5. 항체의 생산과 정제 | 34 |
| 제 2 절 소바이러스설사병(BVD) 항원 진단용 검사키트의 항체 함량설정 | |

| | |
|--|----|
| | 36 |
| 1. 검사 스트립의 항체 (Capture)의 함량 설정 | 36 |
| 2. 항체-금 접합체(Gold-conjugate)의 함량 설정 | 40 |

<제2세부과제: 비아이티밸류>

| | |
|---|----|
| 제 1 절. 휴대용 정량 분석기의 E/S(Engineering Sample) 시스템 개발 | 42 |
| 1. 외관 Design 및 상품화용 목업 | 43 |
| 2. 광학계 개발 | 45 |
| 3. 임베디드 PCB 개발 | 47 |
| 4. 유무선 통신이 가능한 Connection부 | 48 |
| 제 2 절. 휴대용 정량 분석기 상용화 소프트웨어 개발 | 49 |
| 1. 검사 프로세스 개발 | 49 |
| 2. 소프트웨어 구성 | 51 |
| 3. Calibration 소프트웨어 개발 | 52 |
| 4. 고객 Interface를 위한 기각 UI 개발 | 54 |
| 5. 리더기 개발자 또는 키트 개발자용 PC 소프트웨어 개발 | 57 |
| 제 3 절. 리더기 성능 테스트 | 58 |
| 1. 정확도 측정 | 58 |
| 2. 동적범위와 비례도 측정 | 60 |
| 3. 기기간 재현성 측정 | 60 |

<제3세부과제: 농림수산검역검사본부>

| | |
|---|----|
| 제 1 절 휴대용 모니터링 진단시스템의 평가를 위한 평가 기반 구축 | 62 |
| 1. 평가용 기초물질 및 표준물질 확보 | 62 |

| | |
|---|----|
| 2. BVDV 표준물질 제조 및 확인 | 68 |
| 제 2 절 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 유효성 평가 | 72 |
| 1. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 유효성 평가 | 72 |
| 2. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석 | 74 |
| 3. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 실험실내 유효성 평가 | 74 |
| 제 3 절 광학 리더기의 범용성 테스트 | 75 |
| 1. 류케미아 바이러스 (FeLV) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석 | 75 |
| 2. 로타 바이러스 (Rota virus) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석 | 77 |
| 3. 범백혈구감소증 (Feline Panleukopenia virus, FPV) 신속키트의 항 원 역가별 정성 분석 | 78 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 81 |
| 제 1 절. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도 | 81 |
| 제 2 절. 관련분야의 기술 발전에의 기여도 | 82 |
| 1. 기술적 측면 | 82 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 83 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 84 |
| 1. 상품화 및 사업화 전략 | 84 |
| 2. 개발 시제품 | 84 |
| 3. 특허출원 | 90 |
| 제 6 장 참고문헌 | 92 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

현재 여러 연구기관이나 회사에서 반려동물과 산업동물에서 나타나는 질병을 진단하기 위해 Lateral flow immunoassay⁽¹⁾ 방법을 기반으로 하는 진단키트를 개발하여 상용화 하였다. 이러한 진단키트는 현장에서 신속하게 질병의 진단에 이용 가능하며 (Point of Care Test, POCT), 다른 진단 방법에 비하여 고가의 장비, 전문화된 인력, 짧은 분석 시간등과 같은 장점이 있다. 그러나, 여전히 이들 진단법이 육안을 통하여 감별하는 수준을 벗어나지 못하고 있으며, 분석 결과의 기록을 수동으로 하거나, 정량분석을 할 수 없다는 단점이 있다. 근래에, 몇몇 외국의 기업들에서 이러한 단점을 해결 하고자, Lateral-flow reader를 개발하고 있으나, 장비의 소형화나 호환성은 여전히 해결해야할 문제점으로 남아 있다. 이에 본 과제는 Lateral-flow immunoassay 기술을 이용하여 산업동물인 소에서 높은 유병률과 발병률, 감염성을 보이고 있는 소바이러스설사병(BVD)의 감염여부를 진단할 수 있는 신속진단키트를 개발하고, 또한, 과제를 통해 개발된 BVD 진단키트 뿐만 아니라 기 개발된 키트에 대해서 광학 유비쿼터스 정량 진단시스템을 적용한 휴대용 정량분석 장치 개발을 통해 축산농가의 소득증대 및 국가기관의 방역 사업에 이바지 하는 것을 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 소 바이러스설사병 (BVD) 항원 신속진단 키트 개발

- 소 바이러스성 설사증 바이러스 (Bovine viral diarrhoea virus, BVDV)는 전 세계적으로 산재된 소 바이러스성 설사병 (BVD)의 원인체로서, 설사에 의한 급성폐사 이외에도 임신소의 유산 또는 사산, 호흡장애, 백혈병과 유사한 증상 등을 일으킨다⁽²⁾.
- 임신 40일에서 120일 사이에 BVDV에 감염되면 태아가 면역체계를 갖추

기 전이기 때문에 BVDV를 자기 몸의 일부로 인식하여 면역체계가 작동하지 않고 바이러스를 계속 갖게 되는 지속감염(persistent infection:PI) 소가 된다^(3,4). 이 지속감염 소는 평생 바이러스를 배출하게 되어 다른 비감염소에게 BVDV를 전파시키기 때문에 BVD 방역에 매우 중요하다. 이 경우 PI 소에서는 BVDV에 대한 항체가 생성되지 않기 때문에 BVDV 항원을 검출 할 수 있는 검사법이 필요 하다.

- BVDV는 감염된 소의 오줌, 침과 콧물, 분변, 오염된 사료, 물건 등에 의해 소에서 소로 또는 소 집단 간에 쉽게 전파된다. PI 소를 제외한, 나머지 소에서 BVDV 감염 여부는 항체 검사를 통해 감염군과 비감염군으로 구분한다.
- 종래 BVDV에 대한 항체를 진단하는 방법으로 바이러스중화시험⁽⁵⁾, 효소면역항체를 이용한 엘라이자 (ELISA)⁽⁶⁾ 등을 사용하며, 항원을 진단하는 방법으로는 형광항체법⁽⁷⁾, NPLA(neutralization Peroxidase)⁽⁶⁾, Linked Immunosorbant Assay, 전자현미경법, PCR (polymerase chain reaction)⁽⁸⁾ 등이 있다. 이들 방법은 전문화된 인력 및 실험장비를 필요로 하며 진단시간도 길어 현장에서 사용하기는 부적합하다.
- 신속진단 키트개발 시 반드시 필요한 골드 콜로이드 (Gold colloid) 합성, 이를 이용한 컨쥬게이션 (conjugation) 전반의 기술과 제작 역량 및 풍부한 임상 시험 경험을 토대로 적은 양의 임상 검체에서도 신속하고 정확한 진단을 위한 높은 민감도, 특이도, 재현성을 실현, 신뢰성 있는 제품을 개발하고자 하였다.

나. 휴대용 정량분석 장치 개발

- 동물 집단에서 질병 발생상황을 실시간으로 감시해야하는 이유는 크게 두 가지로 요약할 수 있는데, 인수공통전염병 측면에서 볼 때 동물의 질병이 인간에게 영향을 미칠수 있다는 점과 질병 유입에 따른 막대한 경제적 피해 때문이다.
- 이러한 감시활동은 국내적으로 질병의 조기검출과 확산방지의 수단으로 중요한 역할을 하며 우리나라에서는 구제역, 돼지열병, 조류인플루엔자 등의 사례를 통하여 그 중요성을 이미 경험 한 바 있다.

- 또한 대외적으로는 국제기구에 자국의 질병발생 상황을 보고해야할 의무 사항으로 질병발생 수준은 곧 축산물의 국제교역과 직접적인 관련이 있다고 할 수 있다. 특히 동물의 주요 전염병에 대한 진단법과 관리기술이 발전됨에 따라 질병을 조기에 검출하고 집단수준에서 질병이 전파되는 위험을 예측하는 능력이 향상되면서 모니터링의 중요성은 더욱 부각되고 있다.
- 대부분의 선진국에서는 이러한 시스템을 국가적으로 운영하고 있고, 특히 NAHMS(National Animal Health Monitoring System) 조직에서는 미국 내 가축과 가금의 위생에 대한 국가차원의 연구를 축종별로 수행하고 있다. 이와는 별도로 미국동물위생협회(US Animal Health Association, USAHA), 미국수의실험진단협회(American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, AAVLD), 동·식물검역청과 협력하여 NAHRS(National Animal Health Reporting System)를 가동하여 동물 질병의 존재 유무를 월단위로 국가감시기구(National Surveillance Unit)에 보고함으로써 질병 발생 상황을 체계적이고 종합적으로 관리하고 있다.
- 이와 유사한 기구로서 호주에서는 NAHIS (National Animal Health Information System)가 운용되고 있다. 특히 국가별로 중요하게 고려되는 질병으로서 고병원성 조류인플루엔자, 구제역, 돼지열병, 우결핵 등에 대해서는 개별적인 감시 시스템을 가동하고 있는 실정이다. 우리나라는 가축방역사업계획 및 실시요령에 의하여 축종별 주요 질병에 대하여 가축방역사업을 추진하고 있으며, 연간 국비 (지방비 포함) 예산규모는 검진사업, 병성감정 및 혈청학적 검진사업 항목으로 해마다 큰 폭으로 상승하고 있다.
- 병성감정에 의한 질병 모니터링은 가장 낮은 수준의 수동적(passive) 활동 프로그램으로 병성감정기관에 의뢰되는 환축에 한정된 제한적인 질병 발생 정보를 제공하기 때문에 현장의 실제 질병 발생상황을 정확하게 반영하지 못하는 문제점이 있다. 근본적 원인으로 고가의 검사비용과 오랜 검사시간에 따른 시료채취 방법의 제한으로 발생하는 문제라 할 수 있다.
- 이러한 문제점을 보완하고, 질병별 시료채취 및 병성감정기관에 의뢰되는 검체의 기준 및 지속적 모니터링을 위해 현장에서도 사용 가능한 손쉬운

스크리닝 검사 시스템이 필요하다.

- 또한 가축질병 발생시, 가축의 수출 및 가축질병 청정화 사업에 큰 지장을 초래하므로 지속적인 동물 감염원 통제 (animal reservoir control) 및 잠복감염의 조기진단을 위해 현장에서도 사용가능한 손쉬운 검사법이 필요하다.
- 가축 질병의 현장검사의 신뢰도 있는 병성감정을 위해서는 정량검사가 가능해야 하나 현재의 현장검사 원리인 lateral flow 방식은 정성 검사로서만 이용되며 정량에는 기술적 한계가 있어왔으며, 그 필요성이 대두되고 있다.
- 따라서, 본 과제를 통해 lateral flow immunoassay의 정량 분석이 가능한 범용 신속정량 휴대용 진단시스템을 개발하고자 하였다.

2. 경제·산업적 측면

가. 소 바이러스설사병 (BVD) 항원 신속진단 키트 개발

- 국제수역사무국(OIE)은 가축질병으로 인한 손실액을 축산업 총생산량의 20%로 추정하고 있다.
- 농림수산검역검사본부 보고에 따르면 우리나라에서는 1953년 경상도에서 600여두의 소에서 물 설사를 주로하고 구강점막에 궤양을 보이는 BVD 발생이 처음으로 확인 되었으며, 2008년 유우에서 58% 항체 양성율이 보고되었고, 2009년 다양한 소 유래 가검물에서 BVD를 확인하였고, 2010년에는 한우 송아지에서 BVD 발생을 보고하는 등 최근 까지 국내에서 지속적으로 BVD가 발생하고 있다.
- 2007년~2009년 국내 가축질병 병성감정기관에서 소 질병에 대한 진단건수 415 건중 BVD가 153건 (37%)으로 가장 많은 발생건수를 나타내었다. 연도별로 보면 BVD의 발생은 2007년 18건, 2008년 53건, 2009년 82건으로 증가 추세이다.
- 소에서 설사증을 일으키는 주요 원인으로 BVDV에 의한 설사증세로 총 153 건중 98건 (64.1%)를 차지하였다.
- 2000년과 2002년 국내 구제역 의심으로 신고된 소 중 구제역 음성으로 판명된 시료중 BVD로 진단된 것이 43.7%로 가장 많은 비율을 차지하였

다.

- 이러한 BVD 발병이 우려되는 농가에서는 조기 발견을 위하여 2~3주 간격으로 송아지나 소 혈액 및 귀 조직에서 BVDV 항원 검사를 실시하여야 한다.
- BVD에 의한 직접적인 생산성 손실은 유량 감소, 미성숙 송아지 자발적 도태, 송아지 폐사, 유산 등 번식장애 등에 의한 것이며, 진료 및 치료 비용과 추가되는 노동력등의 비용이 발생한다.
- 비단 국내 뿐만 아니라 최근 캐나다, 프랑스, 미국 등에서 분석한 보고에는 BVD발생으로 소 1두당 연간 11~45만원 정도의 손실을 발생시킨다고 제시하였으며, BVD 청정화를 추진 중인 스위스의 경우 BVD에 의한 직접적인 생산 손실액이 연간 70~140억원으로 추정하였다.
- 따라서, BVD에 발생에 의해 수반되는 경제적 손실을 줄이기 위해서는 지속감염(PI)소의 색출과 백신접종 및 차단방역 등 위생수준을 향상시키는 일이 조화를 이루어야 한다.
- 지속감염(PI)된 소를 가려내는 방법은 이들이 BVD바이러스에 대한 항체는 없으면서 BVD바이러스를 항상 갖고 있으므로 항원검사를 통해 확인할 수 있다.
- 이와 같은 이유로 BVDV 항원을 진단할 수 있는 신속 진단키트의 개발이 필요하다.

나. 휴대용 정량분석 장치 개발

- 가축질병의 신속 정확한 진단을 위해서는 보다 민감하고 특이적인 검사가 필요하다. 특히, 질병 발생시 전파 감염을 막기 위해서 지속적인 동물감염원 통제 (animal reservoir control) 및 잠복감염의 조기진단을 위해 현장에서 사용가능한 손쉬운 정량 검사 또한 필수적이다.
- 현장에서 신속진단이 가능한 진단 시스템은 자동화, 소형화, 정량화 추세로 발전하고 있으며, 현장진단(Point-of-care testing, POCT)의 필요성과 수요가 급증함에 따라서 소형의 질병 진단 시스템에 대한 연구 개발 필요성이 증대하고 있다.
- 현대의 축산 진단산업 분야는 인체 진단 시장과 유사하게 현장진단 하나

로 통합되고 있으며, 현장 및 병원으로 진단 영역이 확장되는 추세이다.

- 이와 관련한 기술 개발이 향후 급성장할 것으로 예상되므로 현장신속진단 시장을 선점하고 동시에 원천기술 확보를 위해서는 신속진단 시스템의 정량화는 전략적 중요성이 매우 크다고 할 수 있다.
- 따라서, 본 과제를 통해 현장신속진단에 이용할 수 있는 키트에 대해 정량화 작업과 데이터베이스 작업을 가능하게 할 수 있는 휴대용 모니터링 진단 시스템을 개발 하고 상용화 하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술 개발 현황

- 가축법정 전염병의 방역을 위해 다각도로 노력하고 있으며 특히, 가축의 혈청학적 검사를 위해 대표집단의 시료채취 방법론 개발, 항체양성률 검사 및 백신 항체 생성률 등을 주기적으로 모니터링할 수 있는 진단 시스템을 구축하고자 노력하고 있다.
- 국내에서는 일부 연구기관 및 회사에서 정성검사를 위한 제품군만이 나와 있는 실정이며, 많은 회사에서 정성검사의 정량검사로 전환의 필요성을 인지하고 산학 또는 업체간 공동연구를 통해 제품화하고자 하고 있다.
- 현재 국내 가축의 혈청학적 진단시장은 전량 수입에 의존하고 있으며 ELISA를 기반으로 하고 있다. 이러한 검사는 고가의 분석장비와 전문인력을 보유하고 있는 농림수산검역검사본부와 사설 병성감정기관에서 검사가 이루어지고 있다.
- 녹십자, 아산제약, 에스디 등의 많은 진단시약 회사에서 Lateral flow immunoassay 기술을 이용 정성 분석을 통한 질병의 진단에 광범위하게 적용되고 있으며 많은 제품이 국내 및 해외에서 판매되고 있다. 그러나 lateral flow immunoassay를 통한 정량 기술의 개발은 아주 미비한 수준이다.
- 또한 국내에서는 KIST, ETRI, 충남대, 고려대 등에서 자기저항 바이오칩, 센서 연구를 수행하고 있으며, 바이오 분자-자기 바코드 조작, 구동 모듈 직접화 개발을 통해 시제품 출시를 준비하고 있는 수준이다.

2. 국외 기술 개발 현황

- 이미 바이오 칩/센서 기술로써 집적화를 통한 정확한 대용량 정보 획득 및 단분자 감지가 가능한 고감도 방향으로 연구가 진행되고 있다.
- 국외에서도 마찬가지로 일부 연구 기관 및 회사에서 정성검사를 위한 제품군만이 나와 있는 실정임. 많은 회사에서 정성검사의 정량검사로 전환의 필요성을 인지하고 산학 또는 업체간 공동연구를 통해 제품화하고자

하고 있다.

- 광우병 및 조류독감과 같은 인수공통 감염의 위험요소를 통제하기 위해 지속적인 동물 감염원 통제 및 잠복감염의 조기진단을 위한 방법론을 개발하고 있는 상황이다.
- 미국 아이텍스 및 화이자(신바이오틱스)에서 고가의 장비와 전문인력을 활용할 수 있는 실험실에서만 사용가능한 제품이 나오고 있는 실정이다.
- 최근 들어, 이들 분석 장비의 소형화에 대한 시장 요구로 ESE GmbH, Inverness, Cozart, Roche 등과 같은 회사에서 휴대용 진단시스템을 개발하였으며, 일부 상용화 하였다 (표 1).

표 1. Lateral flow immunoassay 분석 시스템

| Model | Marketer | Label | Size | Reference |
|-------------------|-----------------------|--------------|----------|-----------|
| ESE-Quant | ESE GmbH | Gold beads | Portable | 9 |
| GoldScan | ESE GmbH | Gold beads | Portable | 9 |
| Mobile Reader 500 | Matest | Gold beads | Desktop | 10 |
| LabU-reader | 77 Elektronika Kft | Gold beads | Desktop | 11 |
| HandU-Reader | 77 Elektronika Kft | Gold beads | Desktop | 11 |
| Cardiac Reader | Roche | Gold beads | Portable | 12 |
| Cholestech LDX | Inverness | Colorimetric | Desktop | 13 |
| Clearblue | Inverness | Colorimetric | Handheld | 14 |
| RapiScan | Cozart | Colorimetric | Handheld | 15 |
| ROSA | Cham science | Colorimetric | Desktop | 16 |
| Defender TSR | Alexeter technologies | Colorimetric | Handheld | 17 |
| AccuScan | Neogen | Colorimetric | Handheld | 18 |
| Uniscan | Unison bioscience | Colorimetric | Handheld | 19 |
| Skannex scanner | Skannex | Colorimetric | Desktop | 20 |

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

<제1세부과제: 베트올(주)>

제 1 절 BVD 진단을 위한 항체 원료 제조

소 바이러스설사병 바이러스(BVDV) 검출을 위한 항체 원료 개발하기 위하여 4 가지 방법을 사용하였다. 이중 2 가지는 단클론 항체를 제작하기 위한 방법이고, 나머지 2가지 방법은 다클론 항체를 제작하기 위한 방법이다. 첫째로, 이미 알려진 BVDV의 두 가지 타입 (타입 1 과 타입 2, 각각 NC_001461과 NC_002032)의 gp53 (E2 단백질)에 대한 유효 항원성 부위에 대해 펩타이드를 제작하고, 이를 마우스에 면역시킨 뒤 hybridoma cell을 선별하여 단클론 항체를 제조하는 방법을 시도 하였으며, 둘째로, BVDV가 감염된 배양액을 마우스에 면역시킨 뒤 hybridoma cell을 선별하여 단클론 항체를 제조하는 방법을 시도 하였으며, 셋째로, 제 2 협동 과제 팀으로부터 제공 받은 BVDV 세가지 타입 (타입 1a, 타입 1b, 그리고 타입 2a)에 대한 gp53(E2 단백질)에 대해 공통적으로 예측되는 유효 항원성 부위에 대한 펩타이드를 제작하였으며, 이를 토끼에 면역시킨 뒤 얻은 혈청으로부터 다클론 항체를 정제하는 방법을 시도 하였다. 마지막으로, 역시 제 2 협동 과제 팀으로부터 제공 받은 BVDV 세가지 타입에 대한 불활화 백신을 토끼에 면역시킨 뒤 얻은 혈청으로부터 다클론 항체를 정제하는 방법을 시도 하였다 (표 2). 각각의 방법에 대한 설명은 아래와 같다.

표 2. BVDV 검출을 위한 항체 원료 제작

| 구분 | 항원 |
|------------------------|---|
| 단클론 항체 (Monoclonal) | Type1(NC_001461) 및 Type2(NC_002032) 유래 2종 펩타이드 |
| | 불활화 NADL(ATCC VR-534) strain 바이러스 |
| 다클론 항체 (Polyclonal) | Type1a, Type1b, 및 Type 2a (검역원제공) 유래 펩타이드 |
| | Type1a, Type1b, Type2a 및 Mix 백신 |

1. BVDV strain간 gp53 (E2 단백질) 서열에 대한 항원성 부위 펩타이드 면역을 통한 단클론 항체 제작

BVDV에서 면역원성이 높다고 보고된 structural protein인 gp53 envelope glycoprotein이 포함하는 특정 펩타이드를 이용한 단클론 항체를 제작하였다. NCBI에 등록되어진 두 종의 BVDV strain (NC_001461, NC_002032)에 대한 전체 아미노산 서열 중 gp53 protein을 추출하여 alignment를 수행하였다. 이를 통해 2개 strain 간에 공통서열을 확인할 수 있었으며, *in silico* method를 이용하여 공통서열내에 존재 하는 항원성 부위를 분석하였다.

면역원성 분석을 위해 사용한 *in silico* method로는 백신의 가능성을 보거나 혹은 중화항체 서열을 예측하기 위해 주로 연구되어진 program들을 이용하였다. 그 중 NIAID의 Immune epitope database and analysis resource인 IEDB(Immune epitope database)를 이용하였으며, 선정된 peptide가 murine에서 MHC II에 binding되어 항체가 생성되는 것을 예측하기 위해 Center for Biological Sequence analysis에서 제공되는 NetMHC II를 이용하였다. BVDV의 면역원성을 분석하기 위해 IEDB에서 Kolarskar & Tongaonkar antigenicity를 분석하였다. 이를 통해 E2 protein의 c-terminal 아미노산 서열에 면역원성이 높다는 것을 확인할 수 있었으며, 동시에 parker hydrophilicity 분석을 통해 대략적으로 270에서 320까지의 아미노산 서열이 공통적으로 높다는 것을 확인할 수 있었다.

두 종의 BVDV strain의 gp53 단백질에 대한 아미노산 alignment와 항원성 부위 예측 결과 SEGPVEKTACTFNVT (Peptide 1)과 EPRDSYFQQYMLKGE (Peptide 2)가 최종적으로 항원결정부위로 선정되었으며, 이에 대한 펩타이드를 합성하였다 (그림 1). 합성된 펩타이드는 항체를 생성하기 위해 마우스에 면역시켰다. 마우스 면역 방법은 아래 2. 불활화 BVDV 면역을 통한 단클론 항체 제작 중 다. 마우스 면역의 방법을 따랐다.

```

BVDV1      HLDCKPEFSYAIKDERIGQLGAEGLTITTTWKEYSPGMKLEDTMVIAWCEDGKLMYLQRCT 60
BVDV2      FPECKEGFQYAIKDRYMGLLGPESLTTTW--HLPTKKIVDSMVPVWCEGKDLKILKTCT 58
. : ** * . *** : ** . : * ** . ***** : * * : * : * * . * * : *

BVDV1      RETRYLAAILHTRALPTS SVVFKKLF DGRKQEDV VEMNDNFEFGLCP CDAKPIVRGKFNTTL 120
BVDV2      KEKRYLVAVHERALSTS AEFMQISDGTIAPDVIDMTDDFEFGLCP CDSKPVKGFNASL 118
. * . *** . : * ** . * * : : * * * * : * . * : * : * : * : * : *

BVDV1      LNGPAFQMVCPIGWTGTVSCTS FNMDTLATTVVRTYRRSKPFPHRQGCITQKNLGEDLHN 180
BVDV2      LNGPAFQMVCPQGWTGRIECLANQD TLDTTVVRTYRRTTFFQRRKCTYKMGEDIHE 178
***** : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : *

BVDV1      CILGGNWTCPVPGDQLLYKGGSI ESKWCGYQFKESEGLPHYPIGKCKLENETGYRLVDST 240
BVDV2      CILGGNWTCTGHEHSLKLDGPIKCKWCGYDFNNSEGLPHYPIGKCLINESGYRYVDDT 238
***** : * * : * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

BVDV1      SCNREGVAIVPQGT LKCKIGKTTVQVIAMDTKLGPMPCRPFYEIIS SEGPVEKTACTFNYS 300
BVDV2      PCDRGGVAIVPTGT VKCRIGNVTQV VVATNNDLGPMP CSPAEVVA SEGPVEKTACTFNYS 298
. * : * * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

BVDV1      KTLKNKYF EPRDSYFQQYMLKGE YQYWF DLEVTDHHRDYFAESILVVVALLGGRYVLWL 360
BVDV2      KTLPNKYF EPRDRYFQQYMLKGE WQYWF DLDSDVHHRDYFSEFIIAVVALLGGKYVLLL 358
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

BVDV1      LVTYMLVSEQKALG 374
BVDV2      LITYTILFEQMAMG 372
* : * * : * * * * : *

```

그림 1. BVDV1과 BVDV2와의 alignment 결과. (Peptide는 빨간색 박스로 표시)

2. 불활화 BVDV 면역을 통한 단클론 항체 제작

가. BVDV 배양

항체 생성을 위해서 불활화된 BVDV를 마우스에 직접 면역시키는 방법을 병행 하였다. 본 연구를 수행하기 위해서 사용한 세포주는 MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney : ATCC CCL22) 이며, 사용한 소 바이러스성 설사증 바이러스 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) NADL strain (ATCC VR-534)을 농립수산검역검사본부에서 분양받아 사용하였다.

MDBK 세포는 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) 배지에서 배양 하였으며 1% antibiotics (streptomycin, penicillin)와 10% horse serum이 첨가된 complete medium을 사용하여, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 계대 배양 시 1X PBS (phosphate buffer saline)로 washing 후, Trypsin-EDTA (GIBCO)를 투여한 상태에서 37°C 2분간 반응하여 세포를 부유하였다.

BVDV의 증폭을 위해 초기 strain을 MDBK가 70% 이상 자란 다수의 T75 flask에 감염을 시켜, CPE (cytopathic effect)가 관찰될 때까지 배양하였다. 그 이후 flask를 밀봉한 후 deepfreezer에 보관하였다. 각 flask를 37°C water bath를 이용하여 녹이며, 다시 -80°C deepfreezer에 넣어 얼리는 freezing-thawing 방식을 3회 반복하여 세포를 파괴하였다. Flask내의 액체에서 세포 용해물 및 기타 물질을 최대한 제거하기 위해 50ml conical tube에 옮긴 후, 910 x g 10min 4°C 조건으로 centrifuge 하여 상층액을 새로운 tube에 넣은 후, 각 상층액을 1ml 씩 tube에 aliquot 하여 -80°C deepfreezer에 보관하였다.

나. TCID₅₀에 의한 바이러스 농도 측정

보관한 바이러스의 농도를 측정하기 위해, TCID₅₀ 방법을 이용하여 측정하였다. 10배수로 희석시킨 바이러스 부유액을 세포에 접종시켜 50%를 감염시킬 수 있는 바이러스의 희석농도를 계산하였다. 간단히, T75에서 자라고 있는 MDBK 세포주를 96 well culture plate에 well 당 30%로 seeding 하였다. 다음날, 바이러스를 원액, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹ 순으로 희석을 하였다. Plate에 세포를 1X PBS로 washing 한 후, 희석한 바이러스를 well 당 100μl 씩, 8 well에 넣어 배양기에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후, 배양 시 사용하였던 complete media를 100 μl 추가로 넣어 3일간 배양하였다. 원액 바이러스를 감염시켰던 well에 충분한 CPE가 관찰되면 1X PBS로 washing 후 세포 고정을 위해 4% paraformaldehyde를 well 당 100μl 투여하여 10분간 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝나면 4% paraformaldehyde를 제거 후 crystal violet을 well당 50μl를 투여하여 5분간 반응하였다. 반응 종료 후 물로 washing하여 바이러스의 세포 감염 정도를 확인 하였다. 50% endpoint는 Reed-Muench⁽²¹⁾ 법이나 Speramn-Karber⁽²²⁾법을 사용하여 계산 하였다. 그 결과, 배양된 BVDV가 최종 10⁶ TCID₅₀/ml의 값을 갖는 것을 확인 하였다 (그림 2).

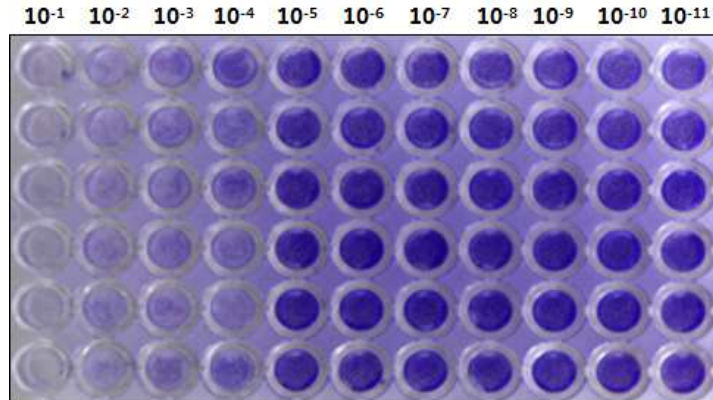


그림 2. BVDV virus titer (TCID₅₀)

다. Mouse 면역방법

상기 1과 2-가 방법에 의해 합성된 펩타이드 100 ug/ul 또는 불활화된 BVDV를 10⁴TCID₅₀/100μl로 희석하여 각각 Balb/C male 및 female 5주령에 복강주사를 실시하였다. 1주마다 3회씩 면역시켰으며, 최종 면역일로부터 4일 후 안와채혈을 실시하여 항체 생성 여부를 확인하였다.

항체 생성 여부는 direct binding assay 방법을 이용하였으며, BVDV를 ELISA plate에 coating 후 안와채혈 혈청을 이용하여 반응성을 확인하였다. Plate coating은 96 well RIA plate에 well당 BVDV를 10³TCID₅₀/100ul로 희석하여 4℃에서 overnight 반응하였다. 다음날, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing하였고, 5% milk in 0.1% PBST 시약을 이용하여 상온에서 30분 동안 blocking하였다. Blocking 종료 후 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing하였고, BVDV 안와채혈 혈청을 1:1000으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 2-4시간 동안 반응하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 5번씩 washing 하였고, secondary antibody (anti mouse-HRP)를 1:10000으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 7번씩 washing하였고, TMB substrate reagent (BD OptEIA)를 투여하여 상온에서 5-10분간 암실에서 반응하였다. 반응 종료 후, 2N H₂SO₄ buffer로 반응을 정지시킨 후, 정지된 well을 ELISA 기계로 흡광도 (450nm)

를 측정하였다 (그림 3).

그 결과, *in house* ELISA 법을 통해 쥐에서 각각의 peptide와 BVDV가 면역반응에 의한 항체 형성 유도를 확인하였으며, 이러한 결과를 근거로 단일 클론항체를 제작하기 위해 다음 과정을 진행하였다.

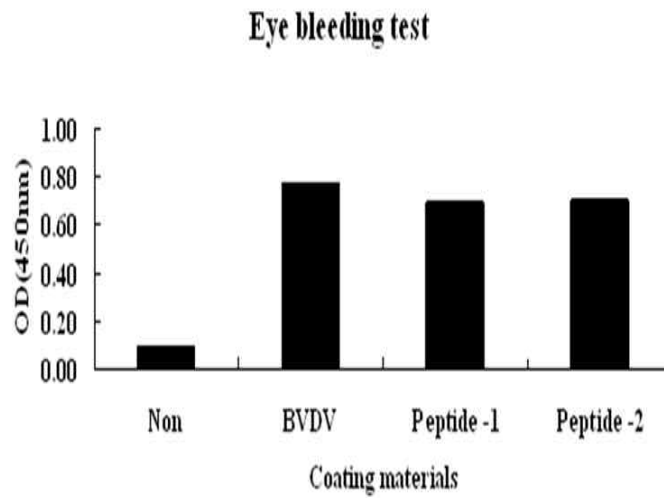


그림 3. ELISA를 통한 마우스 면역 확인

라. BVDV monoclonal antibody 형성을 위한 세포융합(Hybridoma)

상기에서 ELISA를 통해 마우스 면역이 확인 후 세포 융합을 하기 위해서 면역시킨 마우스의 비장 (spleen)을 무균적으로 적출하여 얻어진 비장세포와 형질종세포(myeloma cell)인 SP2/0-Ag14 세포의 세포 융합(cell fusion)은 polyethylen glycol 1500 (PEG 1500, Boehringer Mannheim)을 이용하여 Kohler and Milstein(1975)⁽²³⁾의 방법에 따라 실시하였다. 최종 면역 3-4일 후 마우스의 비장을 무균적으로 적출하고 26-gauge 주사바늘로 적출한 비장을 세절한 후 혈청이 첨가되지 않은 ice-cold DMEM에 부유시켰다. 부유액은 50ml conical tube에 Spreader를 통해 filtration하였다. 이를 3000rpm에서 5분씩 원심분리를 수행하여 비장세포를 얻었다. Red blood cell lysis (RBC)

buffer를 이용하여 비장 세포내 섞여 있는 적혈구를 파괴하였다. 이를 위해 침전된 비장세포를 RBC buffer로 suspension 하여 4°C에서 10분간 보관하였다. 이를 재 원심 분리를 반복하면서 적혈구가 모두 파괴될 때까지 수행하였다. 이 후, 이를 Serum free DMEM 배지로 suspension하여 원심 분리를 수행하였고, 배양 중인 Sp2/0-Ag 14 세포를 suspension하여 침전된 비장 세포와 섞어 주어 원심 분리 수행하였다. 침전된 비장세포와 myeloma 세포를 37°C에서 PEG 1500을 1ml 투여하여 fusion을 수행하였다. 이후 serum free DMEM을 투여하여 원심분리 하였다. 침전된 hybridoma를 15% Complete DMEM 배지에 1일간 배양하였고, 이후 1X HAT(0.1mM hypoxanthine, 0.4uM aminopteri, 16uM thymidine, SIGMA)가 첨가된 15% complete DMEM 배지로 치환하여 2주에 걸쳐 screening을 수행하였다.

마. 단클론항체 선별을 위한 hybridoma screening 테스트

2주 후, 96 well plate에 자라고 있는 hybridoma의 상층액을 이용하여 1차 screening 을 수행하고자 하였다. Screening 방법은 ELISA 방식을 이용하였으며 목적에 맞는 clone을 확보 하고자 하였다. 이를 위해 indirect binding assay 방법을 이용하였으며, BVDV를 ELISA plate에 coating 한 후 hybridoma 세포 배양액과 mouse fusion 당시에 확보하였던 혈청을 양성으로 이용하여 반응성을 확인하였다. 96 well RIA plate에 well당 10^3 TCID₅₀/100ul로 희석하여 4°C에서 overnight 반응하였다. 다음날, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing하였고, 5% milk in 0.1% PBST 시약을 이용하여 상온에서 30분 동안 blocking하였다. Blocking 종료 후 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing 하였고, BVDV hybridoma 세포 배양액을 이용하였으며, 음성 시료로는 myeloma 세포 배양액을 사용하였다. 양성 대조군 시료로는 mouse fusion 당시에 확보하였던 혈청을 1:1000 으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 4시간 동안 반응하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 5번씩 washing하였고, secondary antibody (anti mouse-HRP)를 1:10000으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 7번씩

washing 하였고, TMB substrate reagent (BD OptEIA)를 첨가하여 상온에서 5~10분간 암전상태에서 반응하였다. 반응 종료 후, 2N H₂SO₄ buffer로 반응을 정지시킨 후, 정지된 well을 ELISA 기계로 흡광도(450nm)를 측정하였다.

그림 4에서, BVDV 1st screening test 결과에서 나타나듯이 총 240개 hybridoma clone 중에서 13개의 positive clone 들을 확보하였다. 계대 배양을 위해 확보된 양성 clone 들을 suspension 하여 1X HAT가 첨가된 15% Complete DMEM 배지에 부유하였다. 부유된 각 hybridoma들을 96 well culture plate에 계대 배양하였다. 약 2주 후, 배양이 관찰되는 BVDV clone 중에서 펩타이드 유래 및 불활화바이러스 유래에 대해 BVDV 2nd screening test을 수행하였다 (그림 5).

그 결과 BVD 바이러스 유래로부터 7개의 단클론 양성 hybridoma (mB5, mC10, mD6, mD7, mD8, mF5, 그리고 mG11)을 확보 하였으며, 펩타이드 유래로부터 4개의 단클론 양성 hybridoma (mP1-1, mP1-2, mP2-5, mP2-10)을 확보하였다.

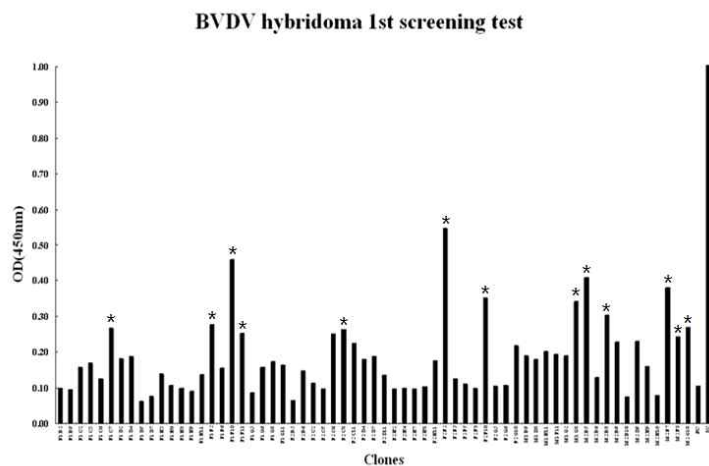


그림 4. The first screening test of BVDV hybridoma.

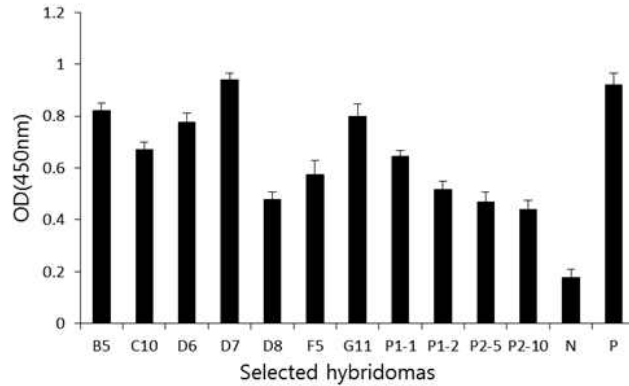


그림 5. The second screening test of BVDV hybridoma.

3. BVDV strain간 gp53 (E2 단백질) 서열에 대한 다클론 항체 제작 (pT3s)

가. 후보 펩타이드 서열 확보

농림수산검역검사본부로부터 제공 받은 BVDV 세가지 타입 (타입 1a, 타입 1b, 그리고 타입 2a)에 대한 gp53 (E2 단백질)에 대해 공통적으로 작용 가능할 것으로 예측되는 펩타이드를 제작하고, 이를 토끼에 면역시킨 뒤 얻은 혈청으로부터 다클론 항체를 제조하는 방법을 시도하였다. BVDV의 각 유형별 gp53 (E2 단백질) 아미노산 서열에 공통적으로 존재하는 항원 부위를 예측하고자, multi-alignment 후에 Domain exclusion analysis 와 Transmembrane domain search를 통하여 post-translational modification에 의해 다른 구조를 형성할 가능성이 높은 부위 및 transmembrane에 위치한 부위를 분석 하였다. 분석 결과, 이들 alignment 서열의 C-term에 가까이 위치하면서 또한 hydrophobicity가 낮고 antigenicity가 높은 펩타이드 서열 SEGPVEKTAC을 확보 하였다.

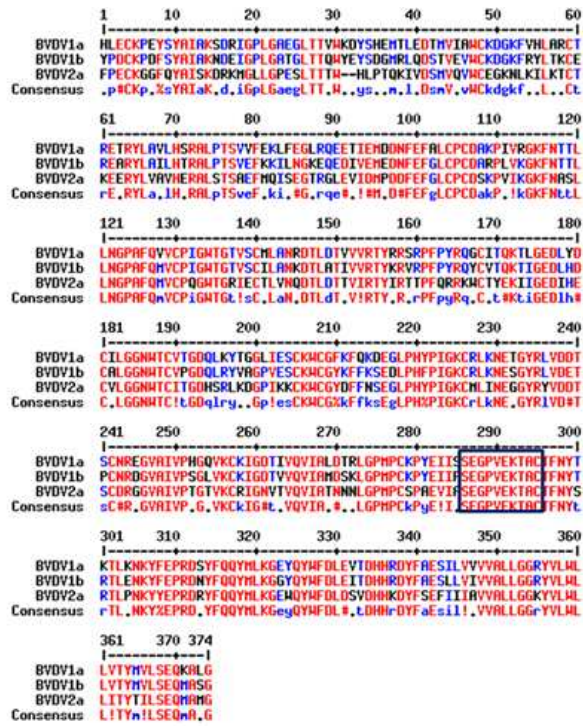


그림 6. BVDV 1a, 1b, 그리고 2a의 gp53 (E2 단백질) alignment 결과.
 (Peptide는 검정 박스로 표시)

합성된 펩타이드는 항체를 생성하기 위해 토끼에 면역시켰다. 토끼에 대한 면역과 ELISA를 통한 항체 생성 여부 screening 작업은 영인프런티어 (Young In Frontier, Korea)에 의해 수행되었다.

나. ELISA를 통한 펩타이드에 대한 항체 형성 여부 테스트

상기로부터 확보된 펩타이드를 BSA (Bovine Serum Albumin) 또는 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)과 콘쥬게이션 시킨뒤 3회에 걸쳐 2마리 토끼에 면역을 실시하였으며, 매회 혈청을 분리하여 ELISA를 통해 펩타이드에 대한 항체가 만들어진 것을 확인 하였다 (그림 7, 8, 9).

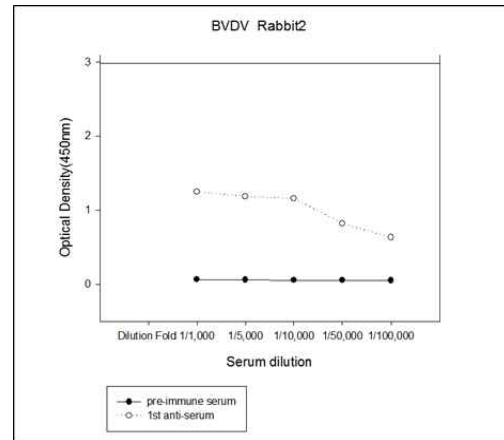
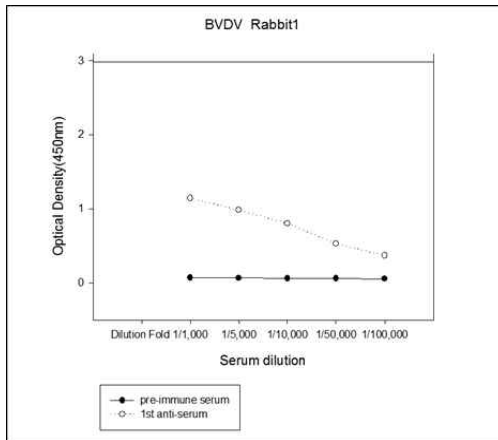


그림 7. Rabbit polyclonal antibody production. 1차 면역후 얻은 항혈청에 대해 ELISA 수행.

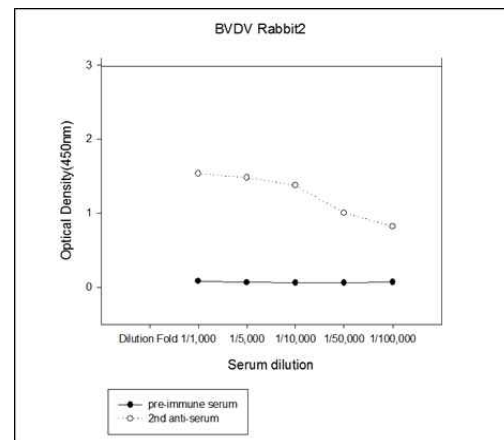
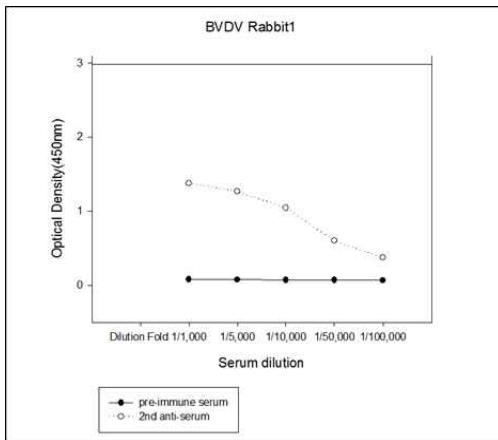


그림 8. Rabbit polyclonal antibody production. 2차 면역후 얻은 항혈청에 대해 ELISA 수행.

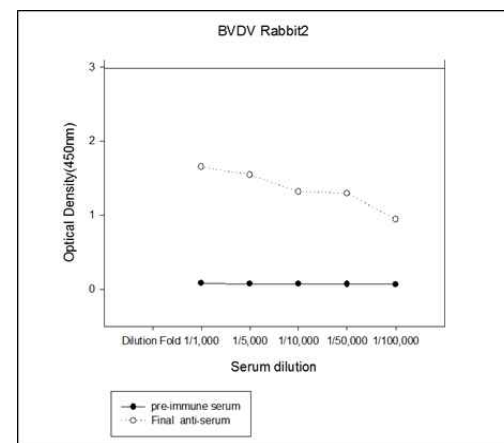
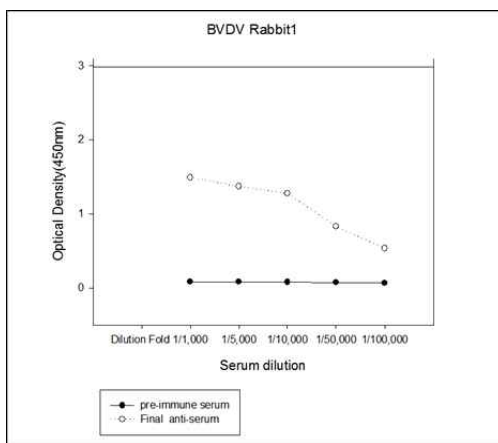


그림 9. Rabbit polyclonal antibody production. 3차 면역후 얻은 항혈청에 대해

ELISA 수행.

ELISA에 사용된 항원은 합성된 펩타이드를 100ng/well 농도로 플레이트에 coating 하였다. 면역된 토끼로부터 얻은 혈청을 PBS로 1/1,000 부터 1/100,000으로 희석하여 100ul/well 농도로 상온에서 2시간 반응하였고, PBST (PBS + 0.1% Tween-20)로 5회 세척 후, 1/5000 희석한 Rabbit-IgG HRP를 2차 항체로 사용하여 1시간 반응 시켰다. PBST 7회 세척후 플레이트에상에 항원과 결합한 항체를 검출하기 위해, TMB substrate (BioFX, SurModics, USA)로 10분간 상온에서 반응 시킨 후, 5N HCl을 well 당 20 ul로 투여하여 반응을 종료 후에 450nm로 측정하여 반응성을 관찰하였다. ELISA를 통해 펩타이드 항원에 반응성을 보이는 항체 (pT3s)가 생성 된 것을 확인한 뒤, 채취한 토끼 혈청을 -70℃에 보관하였다.

다. IFA를 통한 다클론 항체의 BVDV에 특이적 반응 확인

상기로부터 제작된 다클론 항체가 BVDV에 특이적으로 반응하는지 확인하기 위하여 BVDV가 감염된 세포주에서 간접 면역형광 항체기술(Indirect immunofluorescent antibody technique, IFA)을 수행하였다. BVDV를 MDBK (Madin-Darby Kindney: ATCC CCL22) 세포주에 접종한 후, CO₂ 인큐베이터(37℃)에서 4일간 배양한 후 PBS 버퍼(pH7.2)로 세포를 2회 세척하였다. 세척한 세포를 아세톤/PBS (90:10)로 10분간 실온에서 고정 시켰다. 고정된 세포에 상기로부터 제작된 항체(pT3s)를 반응액으로 올린 다음 실온에서 1시간 반응시킨 후 anti-rabbit IgG FITC (플루오로세인 이소티오시아네이트, surmodics)를 제공된 제조서에 따라 1:1000 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 PBS 버퍼로 5분씩 3회 세척한 후 형광현미경으로 관찰하여 BVDV와 특이적으로 반응 하는 것을 확인 하였다 (그림 10).

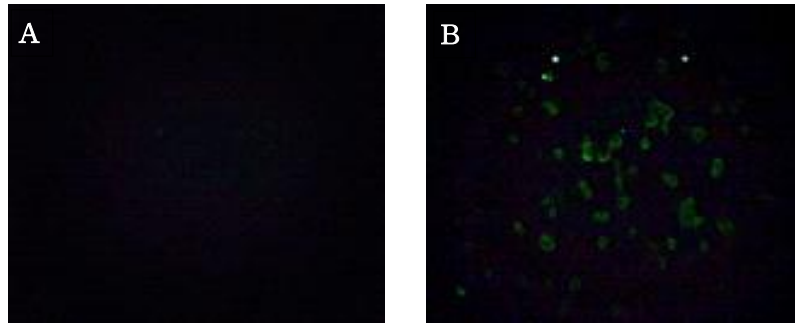


그림 10. IFA 테스트. A: BVDV 비감염 세포에서 pT3s 항체 반응, B: BVDV 감염 세포에서 pT3s 항체 반응. (400x)

4. BVDV 불활화 백신에 대한 다클론 항체제작 (pT1a, pT1b, pT2a, pMix)

가. BVDV 불활화 백신 면역

농림수산검역검사본부로부터 제공 받은 BVDV 세가지 타입 (1a, 1b, 2a) 및 혼합한 (Mix) 백신을 토끼에 면역시킨 뒤 얻은 항혈청으로부터 백신에 대한 다클론 항체를 확보하였다. 백신의 면역은 총 4 차에 걸쳐 2주 간격으로 실시 되었으며, 마지막 접종 후 일주일 후에 토끼로부터 혈청이 확보 되었다. 백신 접종에 의한 토끼에서 BVDV 항혈청을 얻는 과정은 코스모 진텍 (Cosmo Genetech, Korea)에 의뢰하여 수행 되었다. 2차와 3차 백신 접종 후 확보한 토끼의 항혈청은 제 2 협동 과제 팀으로 전달 되어, 항체가 생성 되었는지 여부를 확인하고자 BVDV에 대한 중화 항체 역가 시험을 테스트 하였다.

나. BVDV 불활화 백신에 의해 대한 중화시험

BVDV에 대한 중화 항체가를 알기 위해서 불활화 백신 면역 후 확보된 토끼의 항혈청을 2배 계단희석(2 fold dilution)을 하여 BVDV가 감염된 세포에서 바이러스의 증식억제정도를 측정하여 항체역가를 측정하는 중화 시험을 수행하였다. 표 3과 그림 11 에서 나타나듯이, 중화 시험 결과 BVDV에 대해 백신을 가지고 제작된 다클론 항체를 포함하는 혈청이 6-724배까지 희

석을 하였을 때 세포내에서 바이러스의 증식을 억제하는 것으로 확인 되었다. 따라서, 백신에 의해 BVDV에 대한 항체가 생성된 것을 확인 할 수 있었다.

표 3. 중화 시험 결과 (희석배율)

| Virus Antibody | Type 1a | Type 1b | Type 2a |
|-------------------|---------|---------|---------|
| pT1a | 64 | 6 | 6 |
| pT1b | 256 | 362 | 32 |
| pT2a | 64 | 6 | 724 |
| pMix | 45 | 32 | 64 |

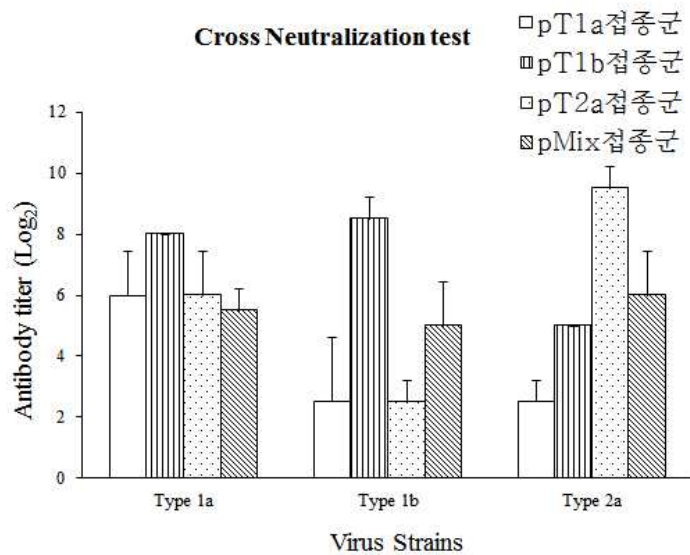


그림 11. 불활화 백신에 의해 생성된 항체의 중화 시험 결과

다. IFA를 통한 다클론 항체의 BVDV에 특이적 반응 확인

상기로부터 제작된 다클론 항체가 BVDV에 특이적으로 반응하는지 확인하기 위하여 BVDV가 감염된 세포주에서 간접 면역형광 항체기술(Indirect immunofluorescent antibody technique, IFA)을 수행하였다. BVDV를 MDBK (Madin-Darby Kidney: ATCC CCL22) 세포주에 접종한 후, CO₂ 인큐베이터(37°C)에서 4일간 배양한 후 PBS 버퍼(pH7.2)로 세포를 2회 세

척하였다. 세척한 세포를 아세톤/PBS (90:10)로 10분간 실온에서 고정 시켰다. 고정된 세포에 상기로부터 제작된 항체(pT1a, pT1b, pT2a, pMix)를 반응액으로 올린 다음 실온에서 1시간 반응시킨 후 anti-rabbit IgG FITC (플루오로세인 이소티오시아네이트, surmodics)를 제공된 제조서에 따라 1:1000 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 PBS 버퍼로 5분씩 3회 세척한 후 형광현미경으로 관찰하여 BVDV와 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다 (그림 12).

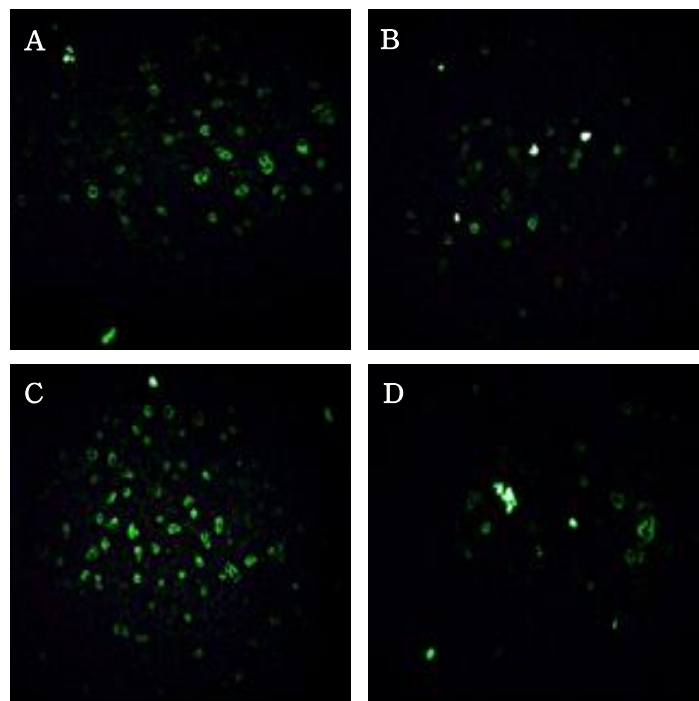


그림 12. IFA 테스트. A: BVDV 감염 세포에서 pT1a 항체 반응, B: BVDV 감염 세포에서 pT1b 항체 반응, C: BVDV 감염 세포에서 pT2a 항체 반응, D: BVDV 감염 세포에서 pMix 항체 반응.(400x)

5. 항체의 생산과 정제

본 과제를 통해서 제작된 단클론 항체와 다클론 항체를 표 2에 정리 하였다. 표 2에서, 단클론 항체는 2종의 펩타이드로부터 유래된 4종 (mP1-1, mP1-2, mP2-5, mP2-10)과 바이러스로부터 유래된 7종 (mB5, mC10, mD6, mD7,

mD8, mF5, mG11)이 제작되었으며, 다클론 항체는 펩타이드 유래 1종 (pT3s)와 4종의 백신으로부터 유래된 4종 (pT1a, pT1b, pT2a, pMix)이 제작되었다. 이들 항체들은 BVDV 항원 진단용 검사키트의 항체로 사용하기 위해서 아래와 같이 Protein A 또는 G 면역친화성 크로마토그래피 방법에 의해 정제되었다.

표 4. 제작된 원료 항체

| 구분 | 항원 | 제작된 항체 | 비고 |
|------------------------|------|-------------------------------------|----|
| 단클론 항체 (Monoclonal) | 펩타이드 | mP1-1, mP1-2, mP2-5, mP2-10 | 4 |
| | 바이러스 | mB5, mC10, mD6, mD7, mD8, mF5, mG11 | 7 |
| 다클론 항체 (Polyclonal) | 펩타이드 | pT3s | 1 |
| | 백신 | pT1a, pT1b, pT2a, pMix | 4 |

가. 단클론 항체의 정제

(1) 단클론 항체의 복수 생산

단클론 항체를 생산하는 것으로 확인된, BVD 바이러스 유래 7개의 단클론 양성 hybridoma (mB5, mC10, mD6, mD7, mD8, mF5, 그리고 mG11)와 펩타이드 유래 4개의 단클론 양성 hybridoma (mP1-1, mP1-2, mP2-5, mP2-10)를 혈청이 함유되어 있지 않은 DMEM 배지로 1회 세척한 후, 1×10^6 개의 세포를 pristane으로 미리 프라이밍한 BALB/C mouse의 복강에 접종하고 10-15일 후 복수를 채취하였다. 수확한 복수를 10,000xg로 5분간 원심분리하고 상층액을 수확하여 이를 검출용 단클론 항체로 사용하였다.

(2) 단클론 항체의 정제

단일클론항체는 면역친화성 크로마토그래피법을 사용하여 정제하였다. Protein G가 콘쥬게이션 되어있는 아가로스 비드를 컬럼에 충전 한 다음 단클론 항체를 포함하고 있는 마우스 복수를 1,300 rpm으로 4°C, 5분간 원심 분리 후 상층액을 첨가 하였다. Protein G 아가로스 비드에 부착된 단클론항체를 용출 완충액 (200mM glycine pH2.5)을 사용하여

1M, pH8.0, Tris buffer가 1/10 볼륨으로 첨가된 1.5 ml 튜브에 연속적으로 용출시킴으로써 순수한 단일클론항체를 분리한 다음 PBS 에 투석하였다. 정제된 단일클론항체는 4°C에 보관하였다.

나. 다클론 항체의 정제

토끼의 항혈청에 포함 되어 있는 5종의 다클론 항체(pT3s, pT1a, pT1b, pT2a, pMix)의 경우 단일클론 항체의 정제 방법과 유사하게 면역친화성 크로마토그래피법을 사용하여 정제 하였다. Protein A가 콘쥬게이션 되어있는 아가로스 비드를 컬럼에 충전한 다음 다클론 항체를 포함하고 있는 항혈청을 1,3000 rpm으로 4°C, 5분간 원심 분리 후 상층액을 첨가 하였다. Protein A 아가로스 비드에 부착된 다클론항체를 용출 완충액 (200 mM glycine pH2.5)을 사용하여 1M, pH8.0, Tris buffer가 1/10 볼륨으로 첨가된 1.5 ml 튜브에 연속적으로 용출시킴으로써 순수한 다클론항체를 분리한 다음 PBS에 투석하였다. 정제된 다클론항체는 4°C에 보관하였다.

제 2 절 소바이러스설사병(BVD) 항원 진단용 검사 키트의 항체 함량설정

1. 검사 스트립의 항체 (capture)의 함량 설정

가. 시험 방법

상기에서 준비된 16종의 항체를 각각 0.78, 1.58 ug/strip의 양이 되도록 정성분석 멤브레인의 검사선 위치에 흡착시키고 각각을 조립하고, 검체 40ul와 검액 40ul를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주 10분 경과 후에 판정 하였다.

나. 시험 결과

- (1) 음성 검액은 농도의 변화에 관계없이 검사선에서 발색을 나타내지 않는다. 음성 검액에 대해 위양성을 나타내는 스트립의 경우 양성 테스트에서 제외하였다.
- (2) 양성 검액은 BVD 바이러스 배양액(10^7 TCID₅₀/ml)을 사용 하였다.
- (3) 기준으로 사용된 항체-금 접합체 (골드 콘쥬게이트)의 항체의 함량은 0.53 ug/strip 이다.
- (4) 표 5에서, 양성 검액의 경우 대부분의 스트립 조건에서 발색이 나타나지 않았으나, pT3s 와 pT1a capture Vs. mE2 conjugate, 그리고 pT1a 와 pT2a capture Vs. pT2a conjugate 에서는 발색이 확인되었다.

표 5. 검사선 항체의 농도별 반응결과

| 항체 pair | | 검사선농도 (ug/strip) | | 항체 pair | | 검사선농도 (ug/strip) | |
|-----------|---------|------------------|------|-----------|---------|------------------|------|
| Conjugate | Capture | 0.78 | 1.58 | Conjugate | Capture | 0.78 | 1.58 |
| mP1-1 | mP1-1 | - | - | mP1-2 | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | - | - |
| | mD8 | - | - | | mD8 | - | - |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | - | - | | mG11 | - | - |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| pT2a | - | - | pT2a | - | - | | |
| pMix | - | - | pMix | - | - | | |
| mP2-5 | mP1-1 | - | - | mP2-10 | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | - | - |
| | mD8 | - | - | | mD8 | - | - |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |

| | | | | | | | |
|------|--------|---|------|------|--------|---|---|
| | mG11 | - | - | | mG11 | - | - |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| | pT2a | - | - | | pT2a | - | - |
| | pMix | - | - | | pMix | - | - |
| mB5 | mP1-1 | - | - | mC10 | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | - | - |
| | mD8 | - | - | | mD8 | - | - |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | - | - | | mG11 | - | - |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| pT2a | - | - | pT2a | - | - | | |
| pMix | - | - | pMix | - | - | | |
| mD6 | mP1-1 | - | - | mD7 | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | - | - |
| | mD8 | ? | ? | | mD8 | ? | ? |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | - | - | | mG11 | - | - |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| pT2a | - | - | pT2a | - | - | | |
| pMix | - | - | pMix | - | - | | |
| mD8 | mP1-1 | - | - | mF5 | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | - | - |
| | mD8 | ? | ? | | mD8 | ? | ? |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | ? | ? | | mG11 | - | - |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |

| | | | | | | | |
|------|--------|---|------|------|--------|---|---|
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| | pT2a | - | - | | pT2a | - | - |
| | pMix | - | - | | pMix | - | - |
| mG11 | mP1-1 | - | - | pT3s | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | ? | ? |
| | mD8 | ? | ? | | mD8 | ? | ? |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | ? | ? | | mG11 | ? | ? |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| | pT1a | - | - | | pT1a | - | - |
| | pT1b | - | - | | pT1b | - | - |
| mE2 | pT2a | - | - | pT2a | - | - | |
| | pMix | - | - | pMix | - | - | |
| | mP1-1 | - | - | pT1a | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | - | - | | mB5 | - | - |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | - | - | | mD7 | ? | ? |
| | mD8 | ? | ? | | mD8 | ? | ? |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | ? | ? | | mG11 | ? | ? |
| | pT3s | - | o | | pT3s | - | - |
| pT1a | - | o | pT1a | | - | - | |
| pT1b | - | - | pT1b | | - | - | |
| pT1b | pT2a | - | - | pT2a | - | - | |
| | pMix | - | - | pMix | - | - | |
| | mP1-1 | - | - | pT2a | mP1-1 | - | - |
| | mP1-2 | - | - | | mP1-2 | - | - |
| | mP2-5 | - | - | | mP2-5 | - | - |
| | mP2-10 | - | - | | mP2-10 | - | - |
| | mB5 | ? | ? | | mB5 | ? | ? |
| | mC10 | - | - | | mC10 | - | - |
| | mD6 | - | - | | mD6 | - | - |
| | mD7 | ? | ? | | mD7 | ? | ? |
| | mD8 | ? | ? | | mD8 | ? | ? |
| | mF5 | - | - | | mF5 | - | - |
| | mG11 | ? | ? | | mG11 | ? | ? |
| | pT3s | - | - | | pT3s | - | - |
| pT1a | - | - | pT1a | | - | o | |
| pT1b | - | - | pT1b | | - | - | |

| | | | | | | | |
|------|--------|---|---|-------------------------------------|------|---|---|
| | pT2a | - | - | | pT2a | - | o |
| | pMix | - | - | | pMix | - | - |
| pMix | mP1-1 | - | - | -: 반응성 없음. o: 반응성 있음. ?: N/A. | | | |
| | mP1-2 | - | - | | | | |
| | mP2-5 | - | - | | | | |
| | mP2-10 | - | - | | | | |
| | mB5 | - | - | | | | |
| | mC10 | - | - | | | | |
| | mD6 | - | - | | | | |
| | mD7 | ? | ? | | | | |
| | mD8 | ? | ? | | | | |
| | mF5 | - | - | | | | |
| | mG11 | ? | ? | | | | |
| | pT3s | - | - | | | | |
| | pT1a | - | - | | | | |
| | pT1b | - | - | | | | |
| pT2a | - | - | | | | | |
| pMix | - | - | | | | | |

Anti-BVDV 항체 pT3s, pT1a, pT2a 항체량이 1.58 ug/strip 에서 양성 검액에 대하여 양성의 결과를 얻었으므로, 이들 항체들을 정성분석 멤브레인에 고정화하는 후보 항체 (capture antibody)로 선정하였으며, 아래와 같이 항체-금 접합체(gold conjugate)와 짝을 이루기 위한 최적의 조건을 확립하고자 하였다.

2. 항체-금 접합체(Gold-conjugate)의 함량 설정

가. 시험 방법

- (1) 표 5로부터, 검사선 스트립의 항체 (capture antibody)가 양성 검액과 반응성을 나타낼 때 금과 접합 (골드 콘주게이트)된 항체로는 0.53 ug/strip 농도의 mE2 (제노바이오텍)와 pT2a 로 나타났다. 이 항체들의 양을 0.53, 0.65, 1.06 ug/strip이 되도록 금 흡착 패드에 고정화 시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하고, 검체 40ul와 검액40ul 를 디바이스 하단에 있는 검액 점적 부위 (S)에 분주한 후, 10분 경과 후에 판정하였다.

나. 시험 결과










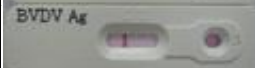


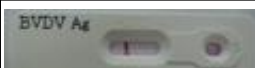
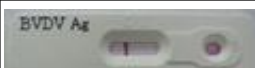

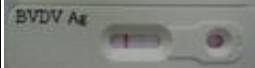


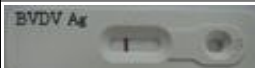

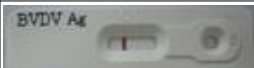

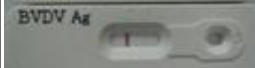
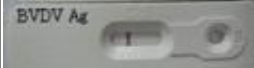
- (1) 양성 검액의 경우 콘주게이트 항체 종류에 상관없이 또한 농도의 변화에 관

계없이 검사선의 발색이 일정 하게 나타났다.

- (2) 음성 검액의 경우 pT1a capture 항체에 mE2 conjugate 항체 쌍을 제외한 나머지 항체 쌍에서 mE2나 pT2a 항체 금-콘쥬게이트 농도를 증가 시키면 검사선에 위양성이 나타났다.
- (3) 상기 결과로부터 골드 접합체의 항체 함량은 pT1a capture, mE2 conjugate 에 한해 0.53 ug/strip 사용 하였다.
- (4) pT3s와 pT2a capture의 경우 콘쥬게이트 항체 농도 증가에 따라 위양성이 발생하므로 키트 제작에 부적합 한 것으로 판명 되었다.

표 6. 골드 콘쥬게이트 항체 의 농도별 반응 결과

| 항체 pair | | 양성 검액 | | | 음성 검액 | | |
|---------|-----------|--------------------|------|------|---------------------|------|------|
| | | 콘쥬게이트 농도(ug/strip) | | | 콘쥬게이트 농도 (ug/strip) | | |
| Capture | Conjugate | 0.53 | 0.65 | 1.06 | 0.53 | 0.65 | 1.06 |
| pT3s | mE2 | + | + | + | - | +/- | + |
| | pT2a | + | + | + | - | +/- | +/- |
| pT1a | mE2 | + | + | + | - | - | - |
| | pT2a | + | + | + | - | - | +/- |
| pT2a | mE2 | + | + | + | - | +/- | + |
| | pT2a | + | + | + | - | +/- | +/- |

| 검액 | 항체 Pair | | 콘쥬게이트 농도 (ug/strip) | | |
|----|---------|-----------|---|--|---|
| | Capture | Conjugate | 0.53 | 0.65 | 1.06 |
| 양성 | pT3s | mE2 |  |  |  |
| | | pT2a |  |  |  |
| | pT1a | mE2 |  |  |  |
| | | pT2a |  |  |  |
| | pT2a | mE2 |  |  |  |
| | | pT2a |  |  |  |
| 음성 | pT3s | mE2 |  |  |  |
| | | pT2a |  |  |  |

| | | | | |
|------|------|---|--|---|
| pT1a | mE2 |  |  |  |
| | pT2a |  |  |  |
| pT2a | mE2 |  |  |  |
| | pT2a |  |  |  |

그림 13. 골드 콘쥬게이트 항체 의 농도별 반응 결과

이상의 결과로 BVDV 항원 진단을 위한 키트 제작을 위한 항체-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 항체로는 mE2 가 선별 되었으며, 콘쥬게이트를 위해 사용되는 항체의 양은 0.53 ug/strip이 적량으로 결정되었다.

최종적으로, 본 과제를 통해 제작된 BVDV 항원 진단 키트의 검사 스트립상의 항체로는 pT1a (1.58 ug/strip)으로 결정 되었으며, 항체-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 항체로는 mE2 (0.53 ug/strip)로 결정 되었다.

<제2세부과제: 비아이티밸류(주)>

제 1 절. 정량 리더기의 E/S(엔지니어링 샘플)개발

○ 정량 리더기 개요

환자의 혈액이나 소변등을 이용하여 반응을 일으키는 반응 정도에 따라 스트립키트상에 생성되는Bar의 농도가 다르게 나오는데, 종전에는 사람의 눈에 의존하는 정성 검사 방식 대신하여 광학시스템을 이용하여 객관적이며, 정량적 검사가 가능하여 검사결과의 Digital 관리가 가능하고, 실내는 물론 야외에서도 검사가 가능한 휴대용 항원-항체 신속 면역칩 정량분석용 면역 진단 시스템

○ 리더기 측정 원리

- 정량 측정용 면역진단시스템은 키트내에 생성된 Bar의 Image를 CCD 이미지센서, PD 또는 PMT등으로 Capture하여 Gray Level의 CCD pixel값으로 계산하고, 미리 정해진 별도의 농도 환산식을 통해서 농도값을 계산함.
- 계산된 농도값은 검사하고자 하는 분석물질(심장질환, 약물검사, 소변검사 등)에 따른 Cutoff값과 비교하여 positive 또는 negative로 표시하여 손쉽게 검사할 수 있음.

1. 외관 Design 및 상품화용 목업

휴대가 가능한 정량 리더기의 엔지니어링 샘플을 제작하기 위해서 Plastic mold cover 렌더링 및 2종류의 목업을 제작하였다. 본 과제에서는 금형을 제작하지는 않았지만 추후 상용화를 위해 필요시 본 목업 도면을 이용하여 곧바로 금형제작을 할 수 있다. 다양한 모양의 키트에 대응하기 위해서 키트 이송트레이에 버켓을 장착할 수 있는 Adaptor를 제작 하여 키트 모양이 다른 경우에도 키트모양에 적합한 버켓을 제작하여 교환해줄 수 있도록 설계하였다. 리더기 커버는 PCB의 외부 인터페이스용 포트가 돌출 될 수 있도록 하였다. 키트의 반응 이미지를 촬영하는 광학부 지지대는 키트 모양과 유사하게 직사각형으로 제작하였고, 포커싱을 맞추기 위해 렌즈의 회전에 의해 포커스 고정이 용이하도록 하였다. 하단 커버에는 DC 배터리로 구동이 가하게끔 배터리 설치 공간을 설치하였다.

가. 외관 디자인은 향후 상품화시 고객의 선택권을 강화하기 위해 2가지 모델을 개발하였다.



그림 14. 휴대용 정량 리더기의 외관 디자인

나. 리더기 뒷단에 블루투스 안테나를 설치하여 야외에서 검사할 때 검사자 뿐만아니라 근거리에 있는 타인도 그 결과를 동시에 확인 할 수 있음.

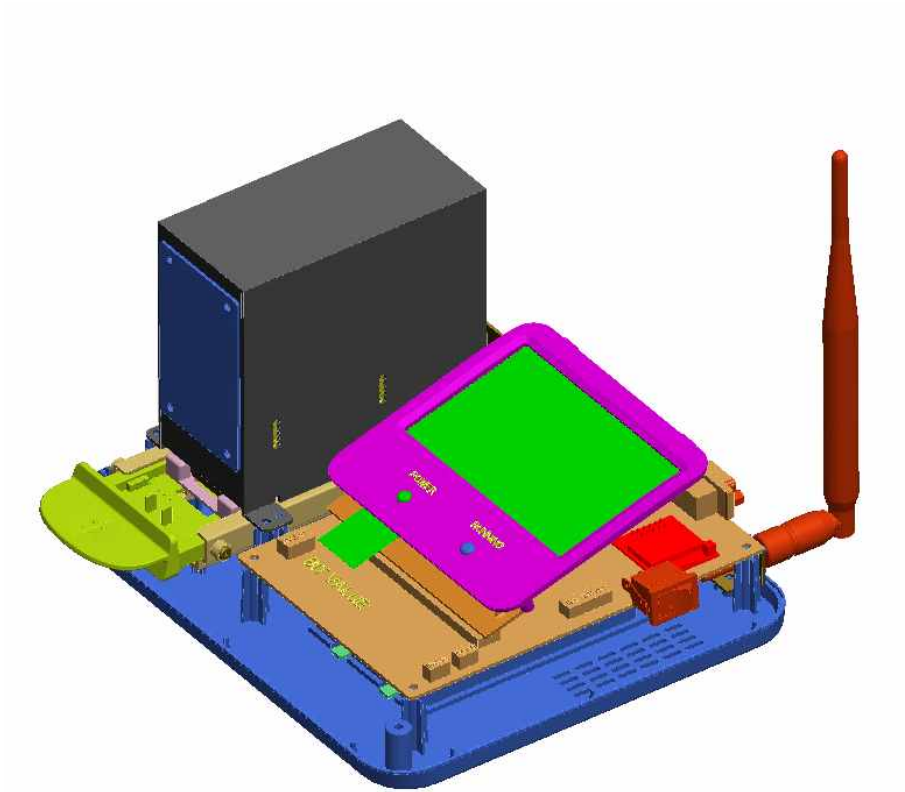


그림 15. 휴대용 정량 리더기 사진 및 내부 구성도

2. 광학계 개발

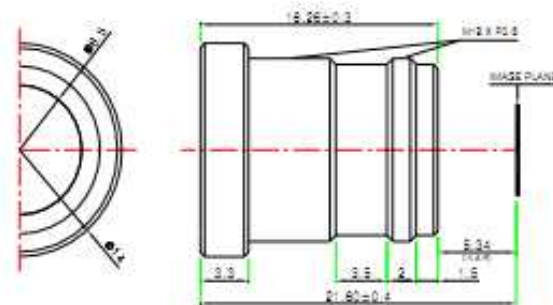
정량 리더기는 측정방식에 따라 스캔방식과 이미지 센서방식이 있다.

가. 스캔방식

스캔방식은 검사부가 이동하는 방식으로 조명과 센서가 같이 움직이므로 검사 결과값이 consistency한다는 점에서 기존에 많이 개발되었으나, 스트립상의 반응밴드의 한 포인트만을 스캐닝하게 되므로 이미지를 고객에게 보여줄 수 없는점과 반응 window가 2개 있는 Double window 키트는 추가적인 메커니즘을 설치하지 않는 한 손쉽게 대응할 수 없는 어려움이 있었다.

나. 이미지 센서 방식

이미지 센서 방식은 검사 대상 키트 대응력이 좋고, 스캔방식과 달리 별도의 구동 스캔 시스템이 필요 없어 cost측면에서도 유리하나 이미지센서의 특성상 검사영역의 확대, 축소 조정이 용이한 장점이 있어, 이미지 처리 기술에서 기술적으로는 더 높은 기술을 요구하지만 상기 장점에 의해 최근 많은 업체에서 적용하는 방식이다. 따라서 본 과제에서도 이미지 센서 방식의 리더기를 개발하였다. 이미지를 인식하는 CMOS센서는 하이닉스사 제품을 적용하였으며, PCB위에 직접 센서를 설정하였다. 렌즈는 시중에서 판매하고 있는 얇가형 렌즈를 구입하여 사용하였으며, 렌즈를 돌려가면서 포커싱을 확인하여 렌즈 위치를 최종적으로 세팅하였다. 광원은 가시광선 영역의 고휘도 White LED를 C-MOS센서 아래에 좌우에서 조명을 비추는 구조로 하였다. 광학시스템의 하우징은 검은색으로 하여 광원이 반사되지 않도록 하였으며, 렌즈 포커싱 조정이 용이한 구조를 채택하였다. COMS 카메라의 FOV(Field of view)는 렌즈를 돌려가면서 기계적으로 조정할 수 있도록 하였다.



Specifications

USE : The lens is intended for use in 1/3 & 1/4" CCD & C-MOS camera.

| | |
|-------------------|--|
| Focal Length | 4.0mm ±5% |
| Relative Aperture | 2.0 ±5% |
| Iris | Fixed |
| Image Size | 1/3" : 14" |
| Angle Of View | 1/3" : 52.2°(V) X 70.8°(H) X 90.8°(D) 1/4" : 38.7°(V) X 52.2°(H) X 66.1°(D) |

그림 16. 이미지 센서에 적용한 렌즈시스템

다. 본 과제의 검사 방식

본과제에서는 CMOS를 이용한 Area Image 방식을 채택하였으며, CMOS

밝기값을 지정된 수식을 사용하여 농도(Concentration)값으로 환산하여 표시할 수 있도록 하였다. 개발 편의를 위해 이미지값의 Peak, Area, Absorbance값을 동시에 확인이 가능하도록 하였다. Image의 노이즈나 test device상에서 발생하는 각종 현상을 보정하기 위해 ROI를 10개 구간으로 나누어 총 밝기기준 하위1개, 상위3개 구간을 Data처리에서 제외시켰다. Image상에서 보고자하는 구간(ROI)의 지정과 각 Control line과 Test line 위치는 각 제품마다 다르므로 별도의 Product DB에 각각의 정보를 저장하고, 필요할 때 불러서 사용한다.

3. 임베디드 PCB 개발

본 과제의 리더기는 휴대가 가능한 소형제품을 개발하기 위해서는 모바일기 기용 최신 CPU인 Arm11 process를 사용하였다. 임베디드 보드는 Arm11 CPU와 RAM, ROM이 있는 CPU 보드 모듈과 카메라 인터페이스보드, LCD 모듈 보드, 고휘도 LED 보드가 있고, WinCE OS를 이용하여 Porting하였다. 즉 보드는 CPU를 포함한 메인보드, CMOS센서가 장착된 카메라보드, 고휘도 LED가 장착된 LED보드, LCD보드 총 4개로 구성되어 있다. CPU 보드는 8층 기판이고, 나머지는 4또는 2층 기판을 적용하였다. 아래는 임베디드 시스템 제작 사진과 블록도이다.



SYSTEM BLOCK DIAGRAM

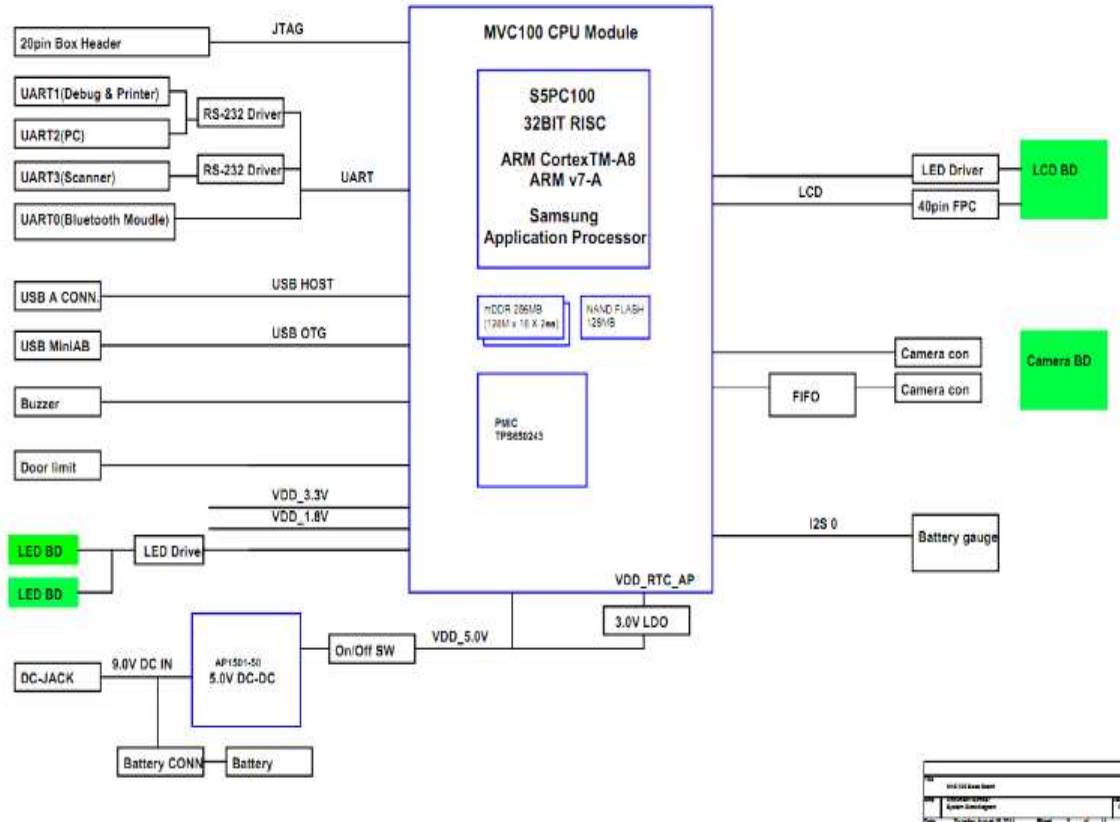
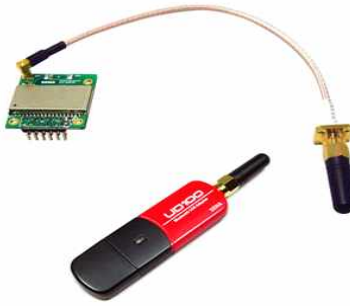


그림 17. 인베디드 시스템 블록도

4. 무선 통신을 이용한 Data통신

검사자가 야외에서 검사한후 근거리에서 있는 사무소나 타인의 서버로 검사 결과를 무선으로 보내기 위한 수단으로 블루투스 모듈을 적용하였다. 블루투스는 안테나 실장형으로 송수신 거리가 약 600m수준이며, 수신부(PC)에는 USB타입의 동글이를 장착하면 되고, 송신부는 아래 그림과 같이 PCB실장 외관 포트 안테나를 장착한다.



| Test No. | Component | Part No. | Logon/Off Time | Display Test | Serial No. | Product Name | Log No. | Test Name | Test Pass | Test Value | Test Unit |
|----------|-----------|----------|----------------|--------------|------------|--------------|---------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 0201 | | 20120114 | 14:35:45 | | Test | 020111 | 020101 | Test | Pass | 100% | % |
| 0202 | | 20120114 | 14:35:46 | | Test | 020111 | 020102 | Test | Pass | 100% | % |
| 0203 | | 20120114 | 14:35:47 | | Test | 020111 | 020103 | Test | Pass | 100% | % |
| 0204 | 12345 | 20120114 | 14:35:48 | | Test | 020111 | 020104 | Test | Pass | 100% | % |
| 0205 | | 20120114 | 14:35:49 | | Test | 020111 | 020105 | Test | Pass | 100% | % |
| 0206 | | 20120114 | 14:35:50 | | Test | 020111 | 020106 | Test | Pass | 100% | % |
| 0207 | | 20120114 | 14:35:51 | | Test | 020111 | 020107 | Test | Pass | 100% | % |
| 0208 | | 20120114 | 14:35:52 | | Test | 020111 | 020108 | Test | Pass | 100% | % |
| 0209 | | 20120114 | 14:35:53 | | Test | 020111 | 020109 | Test | Pass | 100% | % |
| 0210 | | 20120114 | 14:35:54 | | Test | 020111 | 020110 | Test | Pass | 100% | % |
| 0211 | | 20120114 | 14:35:55 | | Test | 020111 | 020111 | Test | Pass | 100% | % |
| 0212 | | 20120114 | 14:35:56 | | Test | 020111 | 020112 | Test | Pass | 100% | % |
| 0213 | | 20120114 | 14:35:57 | | Test | 020111 | 020113 | Test | Pass | 100% | % |
| 0214 | | 20120114 | 14:35:58 | | Test | 020111 | 020114 | Test | Pass | 100% | % |
| 0215 | | 20120114 | 14:35:59 | | Test | 020111 | 020115 | Test | Pass | 100% | % |
| 0216 | | 20120114 | 14:36:00 | | Test | 020111 | 020116 | Test | Pass | 100% | % |
| 0217 | | 20120114 | 14:36:01 | | Test | 020111 | 020117 | Test | Pass | 100% | % |
| 0218 | | 20120114 | 14:36:02 | | Test | 020111 | 020118 | Test | Pass | 100% | % |
| 0219 | | 20120114 | 14:36:03 | | Test | 020111 | 020119 | Test | Pass | 100% | % |
| 0220 | | 20120114 | 14:36:04 | | Test | 020111 | 020120 | Test | Pass | 100% | % |
| 0221 | | 20120114 | 14:36:05 | | Test | 020111 | 020121 | Test | Pass | 100% | % |
| 0222 | | 20120114 | 14:36:06 | | Test | 020111 | 020122 | Test | Pass | 100% | % |
| 0223 | | 20120114 | 14:36:07 | | Test | 020111 | 020123 | Test | Pass | 100% | % |
| 0224 | | 20120114 | 14:36:08 | | Test | 020111 | 020124 | Test | Pass | 100% | % |
| 0225 | | 20120114 | 14:36:09 | | Test | 020111 | 020125 | Test | Pass | 100% | % |
| 0226 | | 20120114 | 14:36:10 | | Test | 020111 | 020126 | Test | Pass | 100% | % |
| 0227 | | 20120114 | 14:36:11 | | Test | 020111 | 020127 | Test | Pass | 100% | % |
| 0228 | | 20120114 | 14:36:12 | | Test | 020111 | 020128 | Test | Pass | 100% | % |
| 0229 | | 20120114 | 14:36:13 | | Test | 020111 | 020129 | Test | Pass | 100% | % |
| 0230 | | 20120114 | 14:36:14 | | Test | 020111 | 020130 | Test | Pass | 100% | % |
| 0231 | | 20120114 | 14:36:15 | | Test | 020111 | 020131 | Test | Pass | 100% | % |
| 0232 | | 20120114 | 14:36:16 | | Test | 020111 | 020132 | Test | Pass | 100% | % |
| 0233 | | 20120114 | 14:36:17 | | Test | 020111 | 020133 | Test | Pass | 100% | % |
| 0234 | | 20120114 | 14:36:18 | | Test | 020111 | 020134 | Test | Pass | 100% | % |
| 0235 | | 20120114 | 14:36:19 | | Test | 020111 | 020135 | Test | Pass | 100% | % |
| 0236 | | 20120114 | 14:36:20 | | Test | 020111 | 020136 | Test | Pass | 100% | % |
| 0237 | | 20120114 | 14:36:21 | | Test | 020111 | 020137 | Test | Pass | 100% | % |
| 0238 | | 20120114 | 14:36:22 | | Test | 020111 | 020138 | Test | Pass | 100% | % |
| 0239 | | 20120114 | 14:36:23 | | Test | 020111 | 020139 | Test | Pass | 100% | % |
| 0240 | | 20120114 | 14:36:24 | | Test | 020111 | 020140 | Test | Pass | 100% | % |
| 0241 | | 20120114 | 14:36:25 | | Test | 020111 | 020141 | Test | Pass | 100% | % |
| 0242 | | 20120114 | 14:36:26 | | Test | 020111 | 020142 | Test | Pass | 100% | % |
| 0243 | | 20120114 | 14:36:27 | | Test | 020111 | 020143 | Test | Pass | 100% | % |
| 0244 | | 20120114 | 14:36:28 | | Test | 020111 | 020144 | Test | Pass | 100% | % |
| 0245 | | 20120114 | 14:36:29 | | Test | 020111 | 020145 | Test | Pass | 100% | % |
| 0246 | | 20120114 | 14:36:30 | | Test | 020111 | 020146 | Test | Pass | 100% | % |
| 0247 | | 20120114 | 14:36:31 | | Test | 020111 | 020147 | Test | Pass | 100% | % |
| 0248 | | 20120114 | 14:36:32 | | Test | 020111 | 020148 | Test | Pass | 100% | % |
| 0249 | | 20120114 | 14:36:33 | | Test | 020111 | 020149 | Test | Pass | 100% | % |
| 0250 | | 20120114 | 14:36:34 | | Test | 020111 | 020150 | Test | Pass | 100% | % |

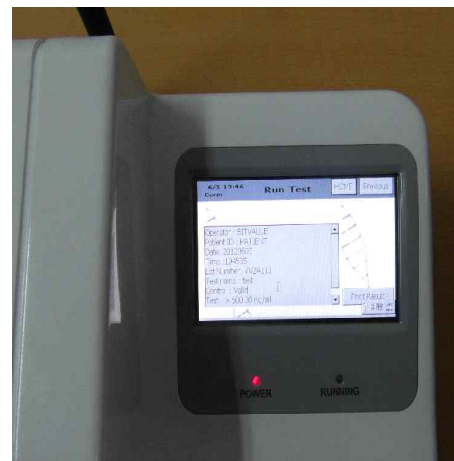


그림 18. 블루투스를 이용하여 리더기와 서버(PC)간 Data통신 작동 확인

제 2 절. 휴대용 정량 분석기 상용화 소프트웨어 개발

1. 검사 프로세스 개발

본 과제에서 적용한 검사 프로세스 개발을 위한 test sequence와 Firmware 구성은 그림 19와 표7을 통하여 요약정리 하였다.

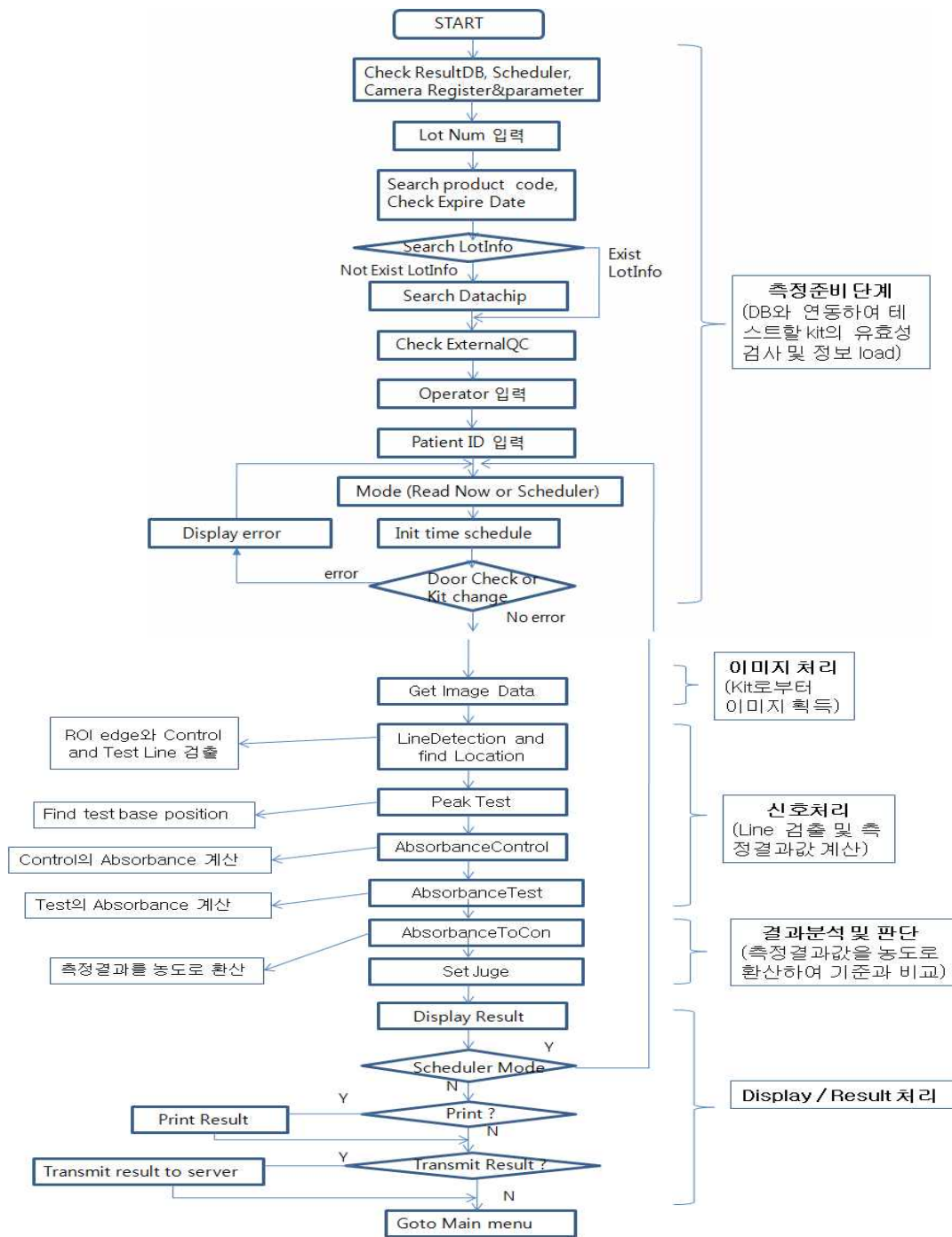


그림 19. Test sequence

표 7. Firmware 구성

| 기능 | file | 내용 |
|------------------|--|------------------------------------|
| HW 초기화 및 setting | Main.c , Adc.c | 기본동작 및 초기화 |
| | 44blib.c, port-IO.c | IO(port) 초기화 |
| DB | db.c | DB set(product, LOT, Result) |
| Interface | BarCode.c | Barcode command 처리 |
| | Key.c | 입력 key set 및 command 처리 |
| | lcdfont.c, lcdlib.c | LCD set 및 command 처리 |
| | Alarmmenu.c | Alarm set 및 command 처리 |
| Menu | Prn_font.c, PrnFunc.c | Printer set 및 command 처리 |
| | Menu.c, Submenu.c, Supermenu.c | 메뉴관련 command 처리 |
| 통신 | comm.c, commFtn.c, commUart.c, Uart.c | 통신관련 command 처리 |
| control | cam_fifo.c, cam_lic.c, | 카메라 (ROI, image 데이터)관련 command 처리 |
| | Isr.c | 인터럽트관련 command 처리 |
| | PowerOn.c | Selfcheck 처리 |
| | smf_conf.c, smf_io.c, smf_fat.c, smf_lpt.c | SmartMedia File System 관련 처리 |
| measurement | RunQC.c, RunTest.c | Calibration QC와 test 관련 command 처리 |
| | InspectDlg.c | 이미지 데이터를 이용한 농도계산 처리 |

2. 소프트웨어 구성

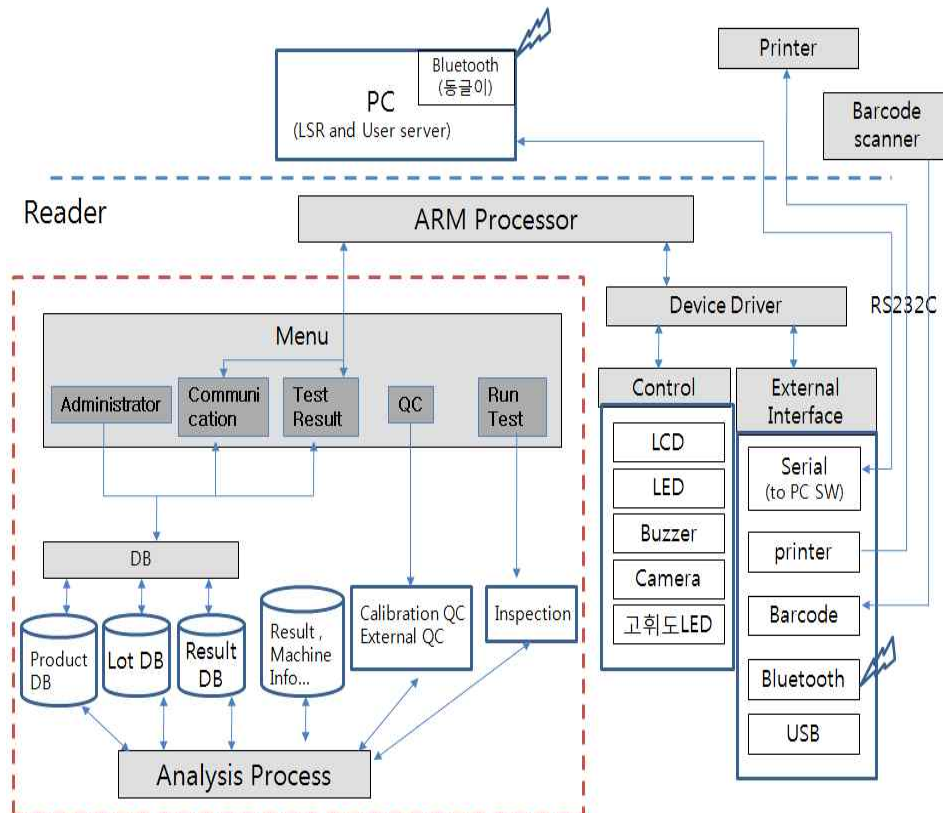


그림 20. 소프트웨어 구성

3. Calibration 소프트웨어 개발

Calibration은 기기간에 발생할 수 있는 차이를 최소화하여 결과에 대한 신뢰성과 검사 정도를 유지하기 위한 방법이다. Calibration은 전반적인 optic system의 보정, kit strip의 uniformity를 일정하게 맞추기 위한 보정, pixel 간 거리 보정등의 목적으로 수행되는 일련의 과정이다. 세부적으로는 calibration QC, blank calibration, scale calibration으로 나누어 질 수 있다. Calibration 과정을 수행할 때에는 line의 intensity가 일정하게 유지된 calibration kit를 기준으로 사용한다.

가. Calibration QC

Calibration QC는 각 기기의 optic system이 동일한 성능을 나타내고 이 성능이 유지될 수 있도록 카메라에 설정값을 보정해주는 과정이다. Calibration QC는 Image grab한 데이터를 기반으로 calibration kit에 있는 line의 intensity를 계산하고 calibrator ID로부터 받은 intensity 정보와 비교한다. 비교한 결과가 일정 범위($\pm 0.3\%$)에 들어오면 calibration 과정이 완료된다. 비교한 결과가 범위를 벗어나면 결과를 바탕으로 카메라의 integration time을 조정 후 다시 측정하게 된다. 이러한 과정을 반복하여 비교한 결과가 일정 범위에 들어오면 과정이 완료된다 (그림 21).

나. Blank calibration

Blank calibration은 면역 kit strip의 uniformity를 일정하게 보정해 주기 위한 과정이다. Blank calibration은 Image grab한 데이터를 기반으로 하여 calibration kit에 있는 line을 제외한 백색 영역의 이미지만을 사용하여 보정 알고리즘(실제 샘플 test 시 kit strip의 uniformity를 보정하기 위해 만들어진 알고리즘)에 들어갈 데이터(shading profile)를 생성한다 (그림 22).

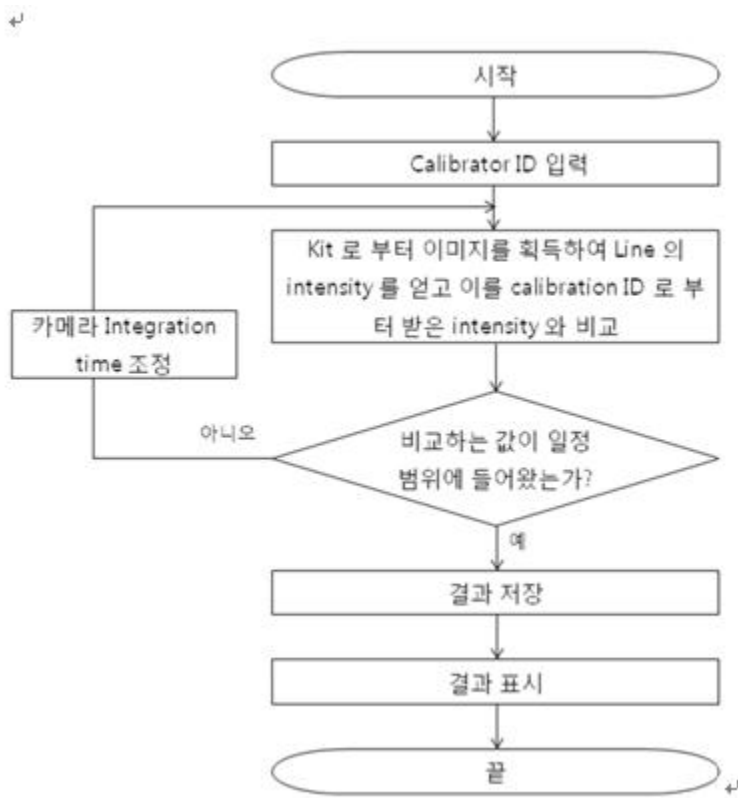


그림 21. Calibration QC 의 운용 순서도

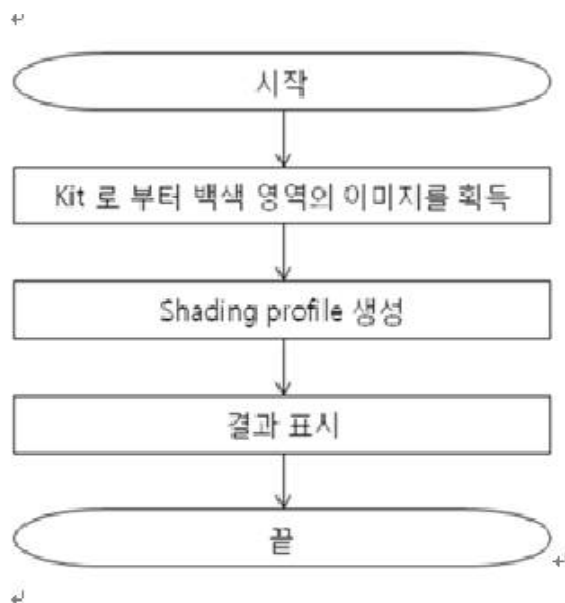


그림 22. Blank calibration 의 운용 순서도

다. Scale calibration

기기에서 인식하는 길이는 카메라 pixel간의 거리와 pixel 수의 곱으로 나타낼 수 있다. 그러나 기기별로 일정 길이를 나타내는 pixel 의수는 다르다. Scale calibration 은 기기별로 pixel 의 거리를 보정함으로써 정확한 길이를 인식할 수 있게 하는 방법이다. Image grab 한 데이터를 기반으로 ROI(Region of Inspection) 를 지정하면 ROI 안의 pixel 수를 측정하고 설정된 거리를 pixel 수로 나누어 pixel 당 거리를 계산하게 된다. pixel 당 거리에 대한 정보는 test 중 거리 정보를 확인 할 때 쓰이며, 기기는 다르더라도 같은 거리를 측정할 수 있는 기준이 된다.

라. Calibration Kit

Calibration kit 는 Calibration 과정을 수행 할 때에 기준이 되어지는 line 의 intensity가 일정하게 유지될 수 있도록 만든 장치이다. 본 과제에서는 Calibration QC와 Blank Calibration이 동시에 진행되도록 하였다.

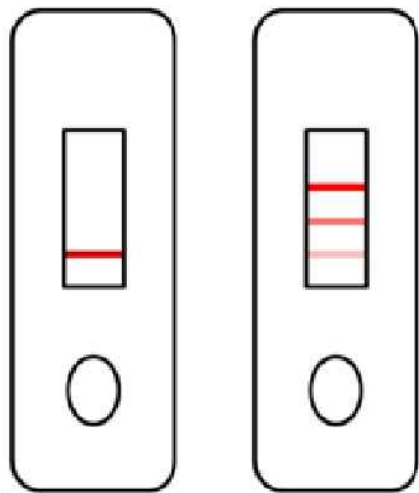
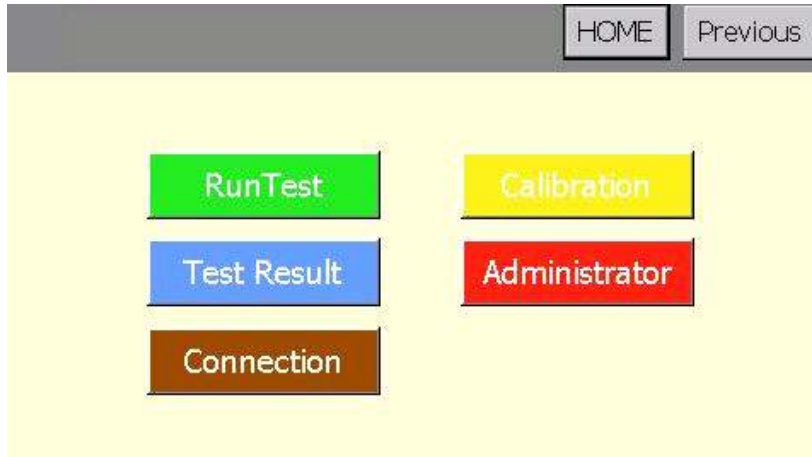


그림 23. Calibration kit 의 예

4. 고객 Interface를 위한 기기 UI 개발

리더기의 main menu는 크게 5가지 아래와 같이 구성된다.

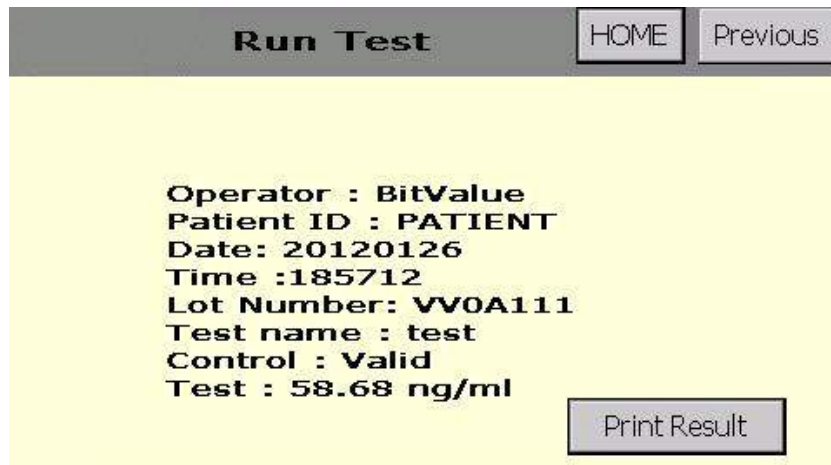


가. Run tests는 리더기를 이용하여 실제 검사하는 과정으로, 생산 lot마다 검사값이 다르므로 lot no를 확인하고, 검사하는 과정으로 하였다. 검사방법에 따라 1개씩 검사하는 방법과 여러개의 키트를 순차적으로 검사하는 Scheduler방식이 있다. Lot no는 data chip의 barcode를 Scan하거나 리더기 LCD상의 가상 keyboard를 이용하여 입력할 수 있다.



< vertual keyboard)

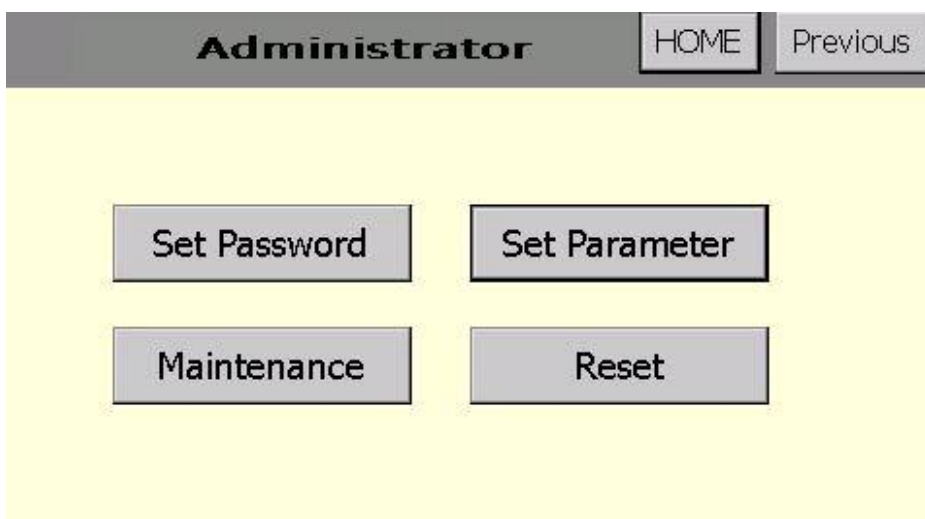
After processing, results are displayed as below

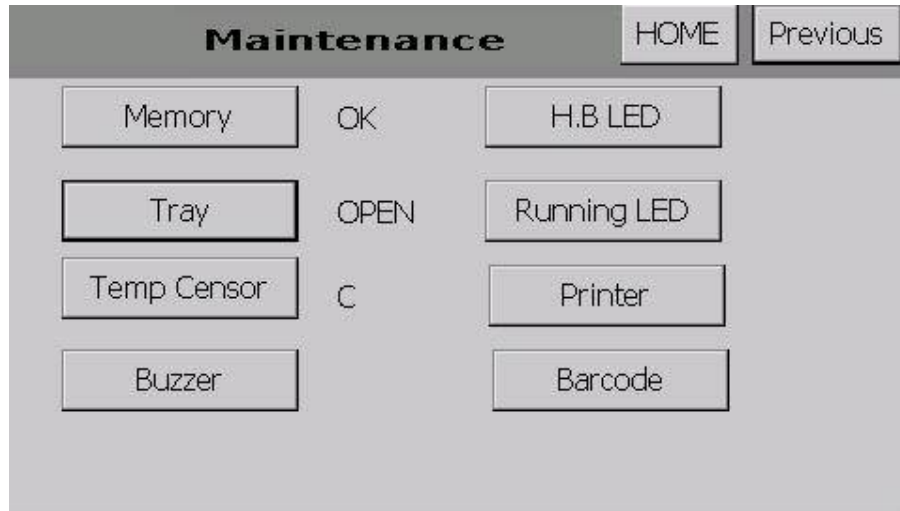


나. Test Result 메뉴는 그동안 검사한 결과를 확인할 수 있는 메뉴이다.

다. Calibration 메뉴는 Calibration을 실시하는부분, Calibration결과를 보는 부분, Calibration parameter를 set하는 부분으로 3부분으로 구별된다.

라. Administrator는 password를 setting부, 날짜, beep, operator, 결과 format을 전송하는 부분인 parameter setting부, maintenance 확인부, Reset부의 기능이 있다.





<maintenance menu>

마. 마지막으로 Connection부는 유선(RS-232C), 무선(블루투스)를 준비하거나 결과를 전송하는것을 Setting하는 기능이 있다.

5. 리더기 개발자 또는 키트 개발자용 PC 소프트웨어 개발

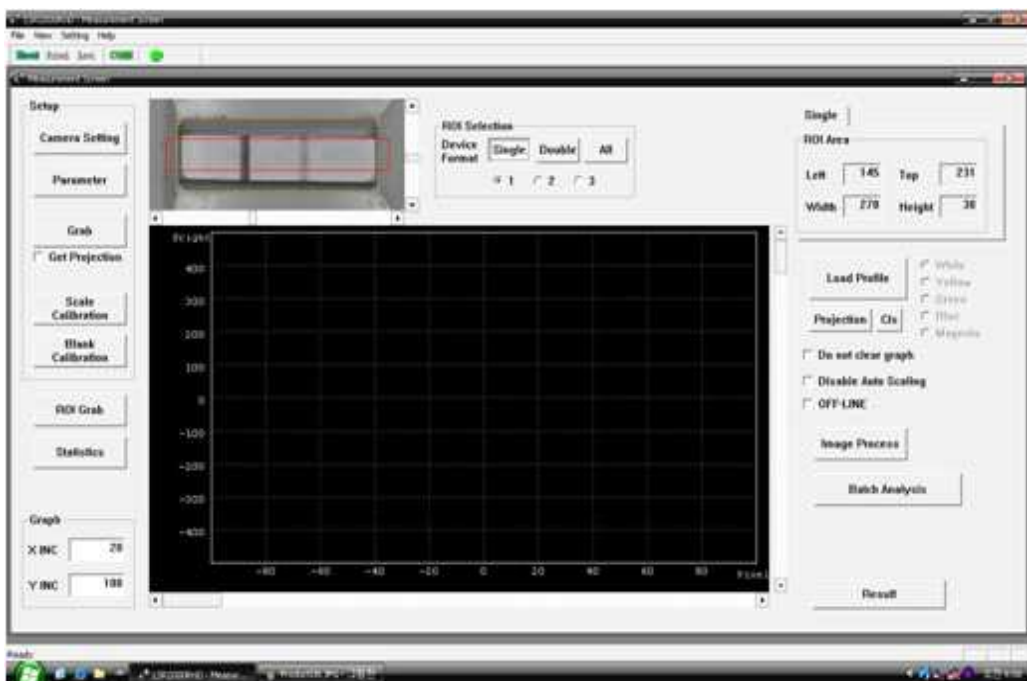


그림 24. PC 소프트웨어 개발

- 본 과제 개발을 용이하기 위해 별도의 개발자용 SW를 개발하였다. 이 기능은 향후 Rapid strip Kit개발자들이 정량 키트를 개발할 때 유용하게 사용할 수 있을 것이다.
- 주요 기능은 다음과 같다.
 - . Setting : Camera set, Parameter set
 - . Analysis : Grab, Scale calibration, Image processing
 - . ProductDB management : ProductDB 생성, 삭제, 수정, 다운로드, 업로드
 - . LotDB management : LotDB생성, 수정, 다운로드, 업로드

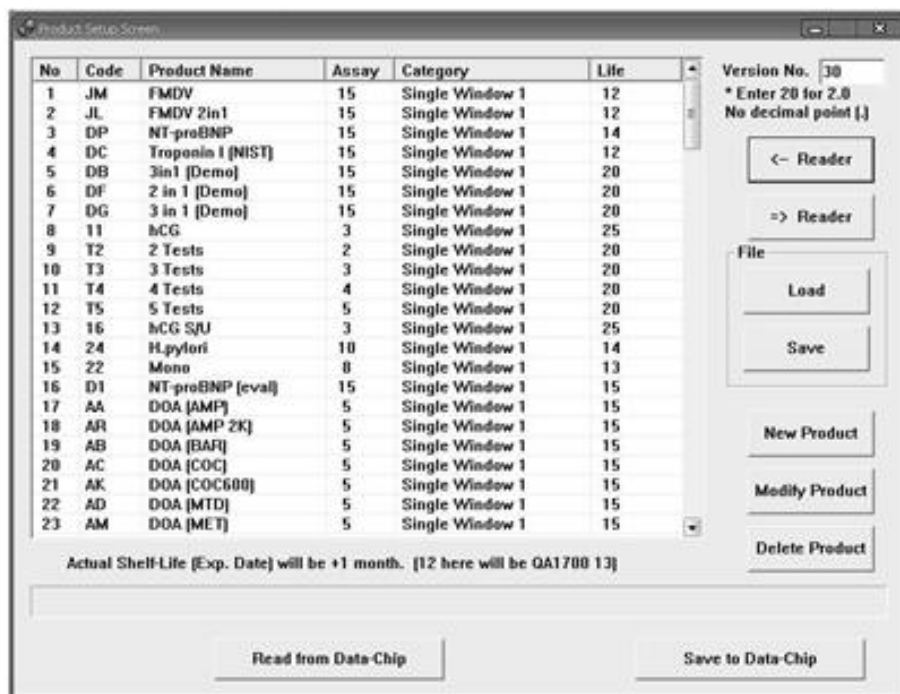


그림 25. ProductDB 화면

제 3 절. 리더기 성능 평가

1. 정확도 측정 (within day)

- 다양한 농도별로 5개의 테스트키트를 준비한다. .
- 장비를 켜고 5개의 테스트키트를 읽는다.

- 장비를 켜다가 다시 켜서 상기의 테스트키트를 읽는다.
- 각 테스트키트 디바이스의 20회 측정하여 측정치의 Coefficient of Variation 을 구한다.
- 허용 기준 Cv 값이 2.0 이하 이어야 한다.

표 8. 리더기 성능 평가-정확도 측정

| | #1(100) | #2(135) | #3(170) | #4(205) | #5(240) |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| test1 | 3928.82 | 3280.85 | 2476.18 | 1409.79 | 408.74 |
| test2 | 3946.19 | 3298.37 | 2468.30 | 1398.22 | 402.67 |
| test3 | 3949.18 | 3290.89 | 2457.73 | 1409.94 | 409.14 |
| test4 | 3936.75 | 3294.68 | 2469.75 | 1416.58 | 402.50 |
| test5 | 3936.74 | 3287.10 | 2464.72 | 1397.68 | 412.71 |
| test6 | 3930.37 | 3276.02 | 2466.77 | 1412.07 | 401.00 |
| test7 | 3960.79 | 3293.97 | 2463.37 | 1407.69 | 401.62 |
| test8 | 3940.87 | 3288.61 | 2462.27 | 1421.38 | 405.54 |
| test9 | 3926.53 | 3289.85 | 2467.48 | 1401.31 | 406.50 |
| test10 | 3940.83 | 3294.80 | 2473.12 | 1412.57 | 408.19 |
| test11 | 3932.50 | 3271.68 | 2462.84 | 1407.20 | 406.62 |
| test12 | 3955.44 | 3296.59 | 2475.93 | 1420.52 | 405.43 |
| test13 | 3933.11 | 3297.67 | 2449.98 | 1406.25 | 418.02 |
| test14 | 3951.29 | 3283.57 | 2472.22 | 1411.85 | 402.97 |
| test15 | 3945.52 | 3292.41 | 2459.78 | 1414.33 | 412.47 |
| test16 | 3952.82 | 3292.35 | 2462.38 | 1411.35 | 414.62 |
| test17 | 3935.88 | 3283.64 | 2465.83 | 1409.90 | 411.26 |
| test18 | 3957.49 | 3289.18 | 2476.80 | 1409.91 | 401.25 |
| test19 | 3938.41 | 3276.82 | 2475.67 | 1399.37 | 411.53 |
| test20 | 3932.14 | 3272.94 | 2453.82 | 1412.55 | 407.48 |
| ave | 3941.58 | 3287.60 | 2466.25 | 1409.52 | 407.51 |
| sd | 10.20 | 8.28 | 7.54 | 6.60 | 4.83 |
| cv | 0.26 | 0.25 | 0.31 | 0.47 | 1.18 |

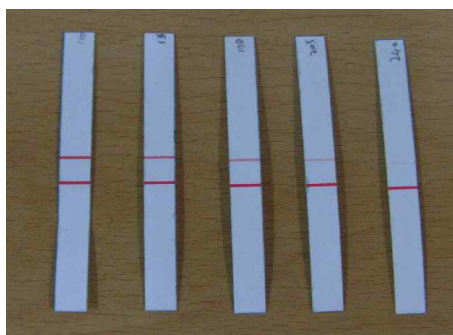


그림 25. 리더기 성능 평가용 농도별 표준 strip

- 상기표에서 확인 할 수 있듯이 동일기기를 사용 5종류 농도별 20번 test결과 : 최대 Cv값이 1.18로 성능평가 통과

2. 동적범위와 비례도 측정 (Dynamic Range and Linearity)

장비는 peak 측정치 5에서 800(상대값) 까지 일관성과 비례성을 가지고 측정할 수 있어야 한다. 각 테스트 키트는 농도별로 1개씩 5종류 이상을 준비한다.

- 5개의 테스트키트 디바이스를 각각 20회씩 측정한다.
- 측정 평균값을 계산한다.
- 각 테스트키트의 5회 평균 값을 비교하여 상관관계를 읽는다.
- Proportion of Variation (R^2) 을 계산한다.
- Proportion of Variation (R^2)이 0.98이상이어야 한다.

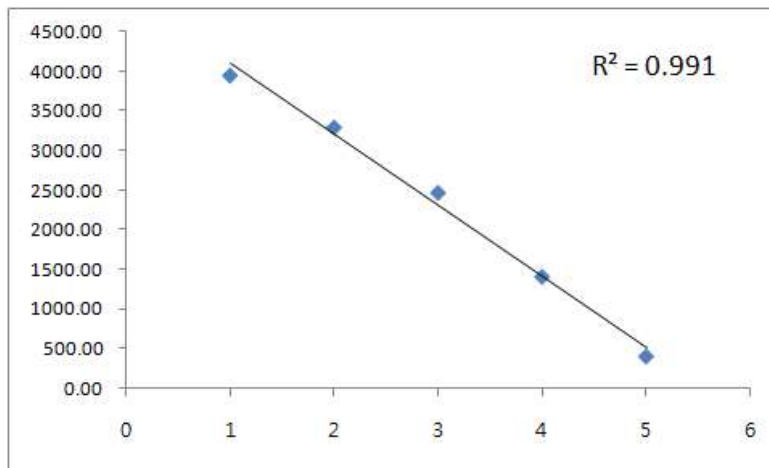


그림 26. 리더기 성능 평가-동적범위와 비례도 측정

3. 기기간 재현성 측정

- 동일키트로 기기간 재현성 확인
- Calibration후 각 기기별 20회 측정
- 측정기기 대수 : 4대

표 9. 리더기 성능 평가-기기간 정확도 측정

| cal | #1 | | #2 | | #3 | | #4 | |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | h | abs | h | abs | h | abs | h | abs |
| test1 | 2127.06 | 3948.73 | 2143.54 | 3949.54 | 2132.67 | 3947.85 | 2132.07 | 3948.34 |
| test2 | 2128.35 | 3949.19 | 2148.39 | 3950.03 | 2128.30 | 3947.47 | 2125.94 | 3947.37 |
| test3 | 2128.50 | 3949.61 | 2149.06 | 3950.21 | 2125.06 | 3947.20 | 2126.62 | 3947.53 |
| test4 | 2123.76 | 3949.19 | 2132.87 | 3948.40 | 2128.53 | 3948.30 | 2141.66 | 3949.61 |
| test5 | 2144.28 | 3952.12 | 2163.93 | 3953.41 | 2111.22 | 3945.76 | 2169.61 | 3953.61 |
| test6 | 2142.41 | 3952.44 | 2165.78 | 3953.92 | 2122.58 | 3947.42 | 2166.52 | 3953.31 |
| test7 | 2139.40 | 3952.34 | 2165.65 | 3953.98 | 2117.79 | 3946.94 | 2153.35 | 3951.07 |
| test8 | 2141.65 | 3952.58 | 2154.77 | 3952.28 | 2119.79 | 3946.87 | 2156.57 | 3951.76 |
| test9 | 2169.50 | 3958.02 | 2154.47 | 3952.62 | 2106.85 | 3945.24 | 2138.29 | 3949.29 |
| test10 | 2132.11 | 3949.77 | 2146.69 | 3951.69 | 2145.16 | 3950.77 | 2138.10 | 3949.20 |
| test11 | 2116.64 | 3947.53 | 2173.87 | 3955.74 | 2155.01 | 3952.43 | 2158.94 | 3952.41 |
| test12 | 2121.95 | 3948.96 | 2162.97 | 3953.77 | 2134.57 | 3949.92 | 2145.52 | 3950.49 |
| test13 | 2130.48 | 3949.79 | 2152.40 | 3952.71 | 2134.95 | 3949.74 | 2131.42 | 3948.18 |
| test14 | 2150.18 | 3952.78 | 2156.89 | 3953.23 | 2126.88 | 3948.58 | 2131.94 | 3948.43 |
| test15 | 2154.38 | 3953.68 | 2171.34 | 3955.70 | 2127.53 | 3948.69 | 2142.39 | 3949.57 |
| test16 | 2138.16 | 3951.22 | 2170.25 | 3955.91 | 2104.84 | 3945.77 | 2160.42 | 3952.77 |
| test17 | 2163.92 | 3955.35 | 2167.46 | 3955.13 | 2142.39 | 3950.95 | 2161.02 | 3952.72 |
| test18 | 2152.92 | 3954.24 | 2168.75 | 3955.58 | 2133.03 | 3949.80 | 2168.89 | 3953.91 |
| test19 | 2161.83 | 3955.32 | 2158.45 | 3954.30 | 2130.78 | 3949.43 | 2144.92 | 3950.50 |
| test20 | 2144.13 | 3953.00 | 2169.91 | 3955.84 | 2132.17 | 3949.64 | 2150.95 | 3951.55 |
| ave | 2140.58 | 3951.79 | 2158.87 | 3953.20 | 2128.01 | 3948.44 | 2147.26 | 3950.58 |
| sd | 14.80 | 2.71 | 10.97 | 2.27 | 12.29 | 1.91 | 14.14 | 2.10 |
| cv | 0.69 | 0.07 | 0.51 | 0.06 | 0.58 | 0.05 | 0.66 | 0.05 |

- 측정된 기기 4대 모두 최대 Cv값이 1이하로 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

<제3세부과제: 농림수산검역검사본부>

제 1 절 휴대용 모니터링 진단시스템의 평가를 위한 평가 기반 구축

1. 평가용 기초물질 및 표준물질 확보

가. BVDV 표준바이러스 선발

Bovine viral diarrheal virus는 *Pestivirus* genus, *Flaviviridae* family로 genome의 구조는 그림27과 같다. BVDV type 1 and 2로 크게는 2종의 genotype이 존재하며 BVDV type 1은 13 sub-genotypes (1a~1m) (Nagai et al., 2008)으로 분류되고 있으며 BVDV type 2는 2 sub-genotypes (2a and 2b)으로 나눌 수 있다. Biotypes으로 분류시는 cytopathic 및 non-cytopathic으로 분류된다.

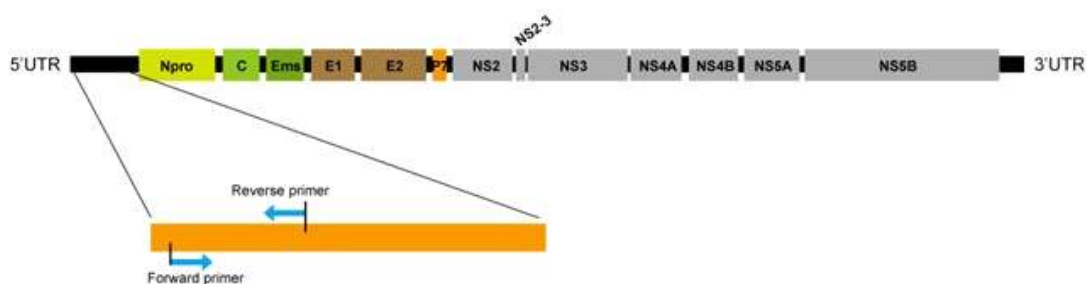


그림 27. BVDV의 genome 구조 및 5'-UTR부분에 대한 PCR 증폭 부위 모식도

5'-UTR 및 Npro 등 단백질에 대한 국내 BVDV 유전형 분석 결과 그림 28과 같이 다양한 유전형이 확인되었다. 확인된 유전형으로는 1a, 1b, 1c, 1n 및 2a 형 등이 확인되었으며, 그중 1a, 1b, 2a가 가장 많은 분포를 나

타냈다. 본 과제 수행시 진단 대상이 되는 표준 BVDV는 국내에 가장 많이 분포하고 있는 1a, 1b, 2a 3종 유전형을 선택하였다. 1a형은 08GB44-1, 1b형은 GB45-2 그리고 2a형은 08Q723 주를 각각 선발하였다.

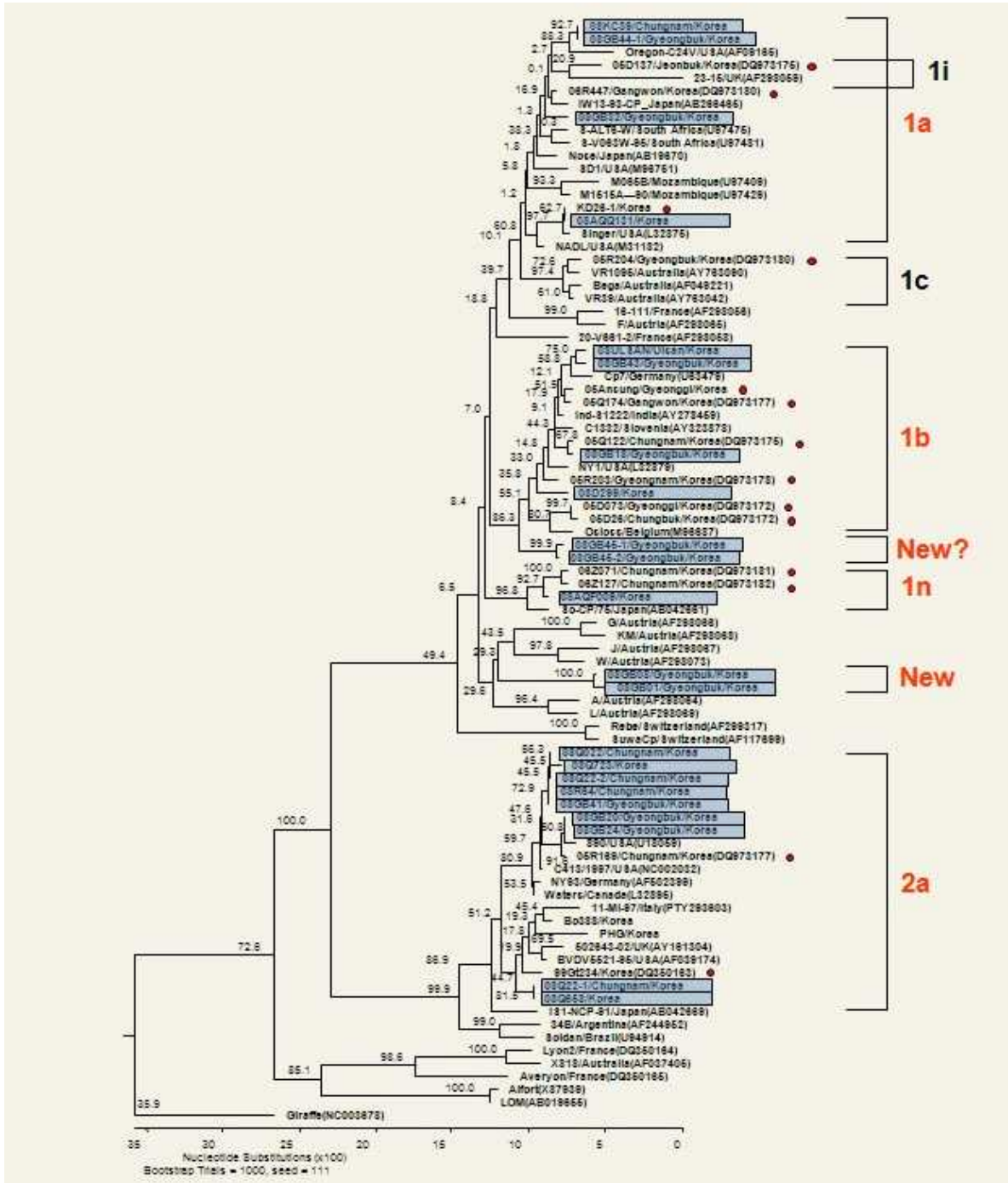


그림 28. 국내분리 BVDV의 5'-UTR부분에 대한 phylogenetic topology

나. 선발된 BVDV의 증식특성 확인

선발된 표준주 08GB44-1, GB45-2 및 08Q723 주의 증식 특성을 확인하고자 각 strain을 계대 배양하면서 유전형 특이 primer를 이용하여 확인하였다. 유전형 1a (T1a) 및 1b (T1b) 특이 primer의 염기서열과 특징을 표 10과 같다.

표 10. BVDV 유전형 특이 primer

T1a

| Name | Sequence | Length | Position | Reference Strains |
|-----------------|----------------------------|--------|----------|-------------------|
| SD1 E2 2089F | AAC GGC TAG CGC AAT GTA TC | 20 | 2089 | SD1 |
| SD1 E2 3902R | GTG GTA CTA TGG TCG GAT CA | 20 | 3902C | SD1 |

T1b

| Name | Sequence | Length | Position | Reference Strains |
|--------------------|---------------------------|--------|----------|-------------------|
| OSLOSS E2 2072F | CGA TTT CGC TCC AGA GAC A | 19 | 2072 | osloss |
| OSLOSS E2 3787R | GCC ATC CCC CCA ACC ATT A | 19 | 3787C | osloss |

다음은 표10의 특이 primer를 이용하여 3차 계대까지 각 계대수에서의 특성의 유지 여부를 RT-PCR로 확인한 것으로 1a형 08GB44-1 (그림 29), 1b 형 GB45-2 (그림 30) 그리고 2a형 08Q723 (그림 31)주에 대한 각각의 결과이다.

1차 passage

2차 passage

3차 passage



그림 29. 1a형 08GB44-1 strain 계대 결과

1차 passage

2차 passage

3차 passage



그림 30. 1b형 08GB45-2 strain 계대 결과

1차 passage

2차 passage



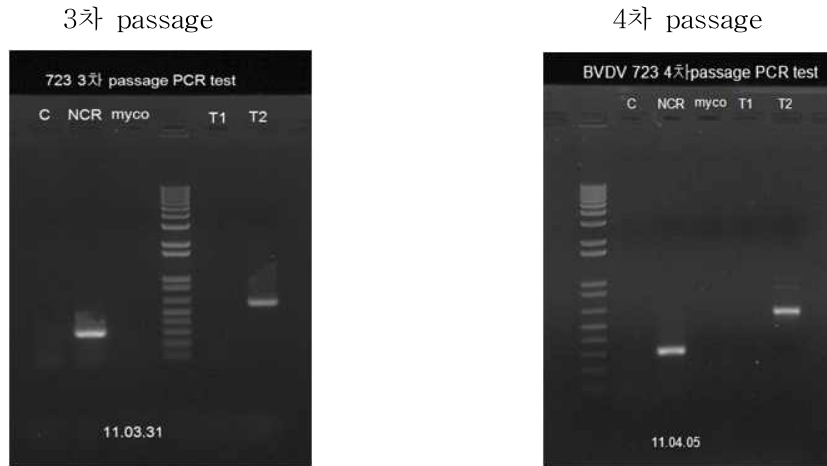


그림 31. 2a형 08Q723 strain 계대 결과

증폭된 각 strain의 NCR(또는 5'-UTR) 및 E2 유전자를 염기서열 분석하고 phylogentic tree를 작성하여 각 유전형의 표준주와 비교함으로써 유전형을 확인하였다. 그림6은 NCR 부위의 염기서열을 이용하여 작성 것이며, 그림 32는 E2 부위의 염기서열을 이용한 것이다.

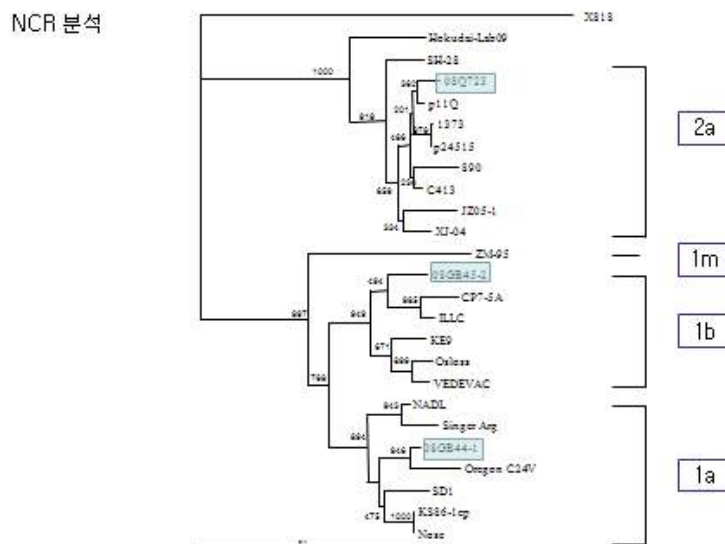


그림 32. NCR 부위를 이용한 phylogenetic tree 결과

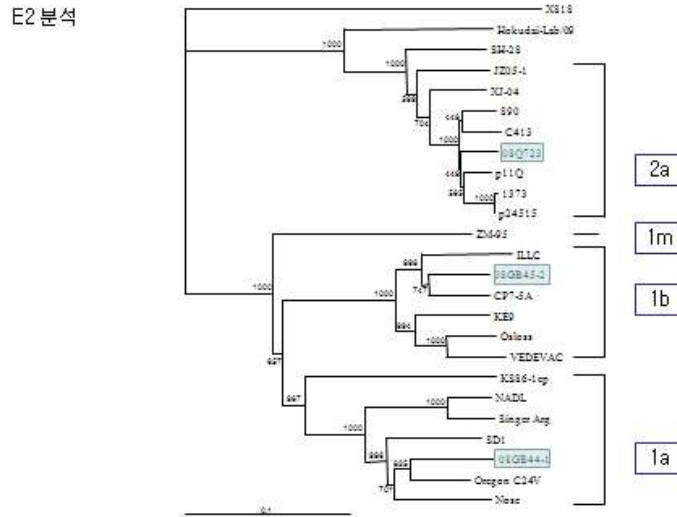
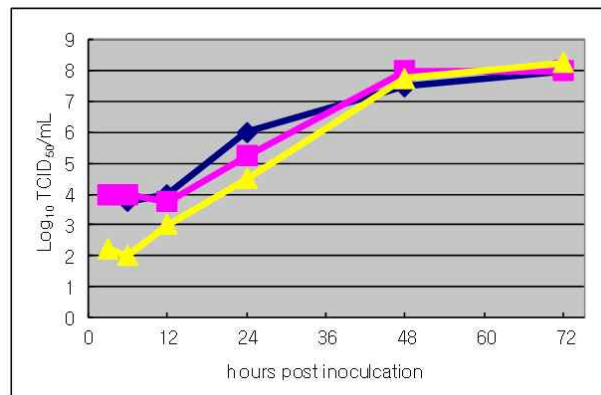


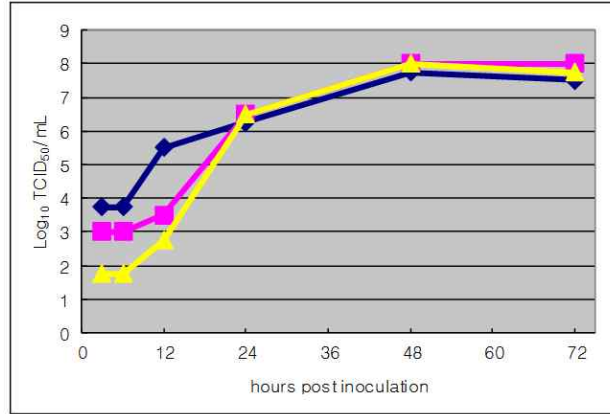
그림 33. E2 부위를 이용한 phylogenetic tree 결과

phylogenetic tree 분석결과 1a형 08GB44-1, 1b형 GB45-2 그리고 2a형 08Q723주 모두 알려진 유전형의 표준주들과 동일한 group을 형성함을 확인할 수 있어 유전형 분류 및 대표주로서 의 특성을 알 수 있었다. 그 외에 BVDV 표준바이러스의 세포배양능을 3일간 배양하면서 그림 34와 같이 확인하였다. 3종 BVDV 표준주가 모두 10^8 TCID₅₀/ml 이상으로 증식됨을 확인하였다.

A.08GB44-1



B.08GB45-1



C.08Q723

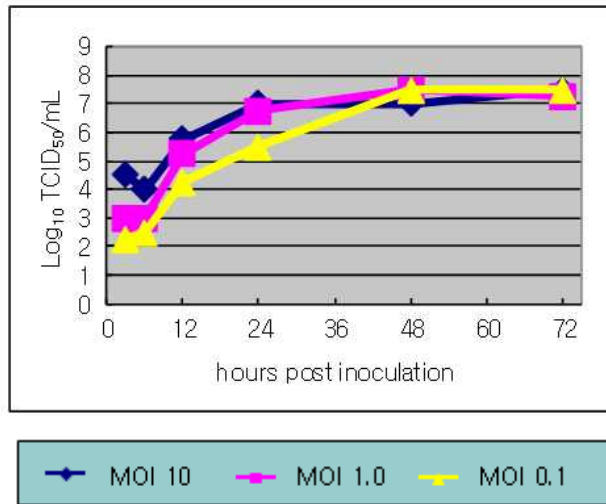


그림 34. 표준주바이러스의 증식능 확인

2. BVDV 표준물질 제조 및 확인

가. BVD 간이 신속항원 키트 평가용 국내유행 유전형 BVD 확보

(1) 국내유행 유전형 BVDV 조사

- 2008년 경기, 강원, 충남, 충북, 전북, 경북 등 78농가 203두 야외

가검물로부터 BVDV를 검색한 결과 33두에서 양성을 확인하였다. 야외 가검물의 종류는 주로 설사분변과 호흡기에서 면봉 채취한 콧물 가검물 또는 유산과 관련한 가검물이었다.

- 야외 가검물로부터 BVDV를 검색을 위한 1차 방법으로는 모든 BVDV를 검출할 수 있는 RT-PCR법(역전사효소-중합효소반응법)을 이용하였다. 이때 사용한 정방향 프라이머 BVD85F는 5'-GCG AAG GCC GAA AAG AGG CTA -3' 이고 역방향 프라이머 BVD391R은 5'-TCC ATG TGC CAT GTA CAG CAG AGA-3' 이다. 해당 PCR 법으로 증폭되는 유전자는 5' 말단의 비전이부위(untranslation region; 5'-UTR)의 307 bp해당한다(도 35). 반응 조건으로는 추출한 RNA를 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 역전사(reverse transcription)를 45°C 30분 실시하였고 PCR은 95°C 15분 반응 후 94°C 20초의 변성(denaturation) 과정, 55°C 20초의 불림(annealing) 과정, 72°C 30초의 연장(extension) 과정을 35회 반복한 후 최종 연장(extention) 과정을 72°C 5분 실시하였다. 도 1과 같이 증폭된 유전자는 코스모진텍(Cosmo genetech, 한국)에 의뢰하여 염기서열 분석하였다.

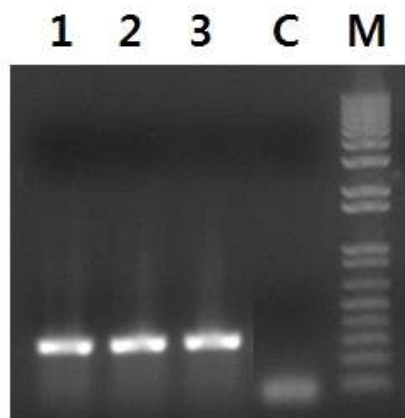


그림 35. BVDV 5'-NCR 부위를 증폭하는 RT-PCR 결과로 모든 유전형의 BVDV가 증폭된 사진. Lane 1 : GB44-1주, Lane 2 : GB45-1주, Lane 3 : 08Q723주, Lane C : 음성 대조, Lane M : 1 Kb DNA 사이즈 마커(size marker)

(2) 국내 유행 BVDV 유전형 선발 및 특징 확인

- 양성 가검물 중 증폭된 5'UTR 부위 유전자의 염기서열 분석 결과를 이용한 계통도 분석에서 BVDV 1a 8두(24.3%), BVDV 1b 10두(30.3%), BVDV 2a가 11두(33.3%) 및 기타 1c, 1i 및 1n 등이 확인되어 BVDV 2a, BVDV 1b 및 BVDV 1a 순으로 분포하였다. 유전형이 확인된 BVDV들은 MDBK 세포주에 접종하여 증식율을 비교하는 한편 BVDV 유전형 특이 프라이머들을 이용한 RT-PCR을 이용하여 유전형 구분의 정확성을 확인하는 한편 조직배양 접종하여 증식율을 확인하였다. 그중 1a형은 GB44-1주, 1b형은 GB45-1 및 2a형은 08Q723주를 선발하였다.
- MDBK세포주에서 증식한 국내분리 BVDV 유전형별 대표주를 BVDV 항혈청을 이용하여 면역 형광항체법으로 확인하였다(그림 36). 음성대조군으로 미접종 MDBK 세포주를 준비하였고, 양성대조군으로 기존에 분리되어 세포변성 효과 있고 특성이 확인된 BVDV KD26-1주를 접종한 MDBK 세포주를 사용하였다.
- 국내분리 BVDV주 GB44-1주, GB45-1주 및 08Q723주를 접종한 MDBK 세포주 모두에서 조직배양 세포의 세포질에서 증식하는 BVDV의 특징과 일치하게 세포질에 보다 강한 형광을 나타내었다.

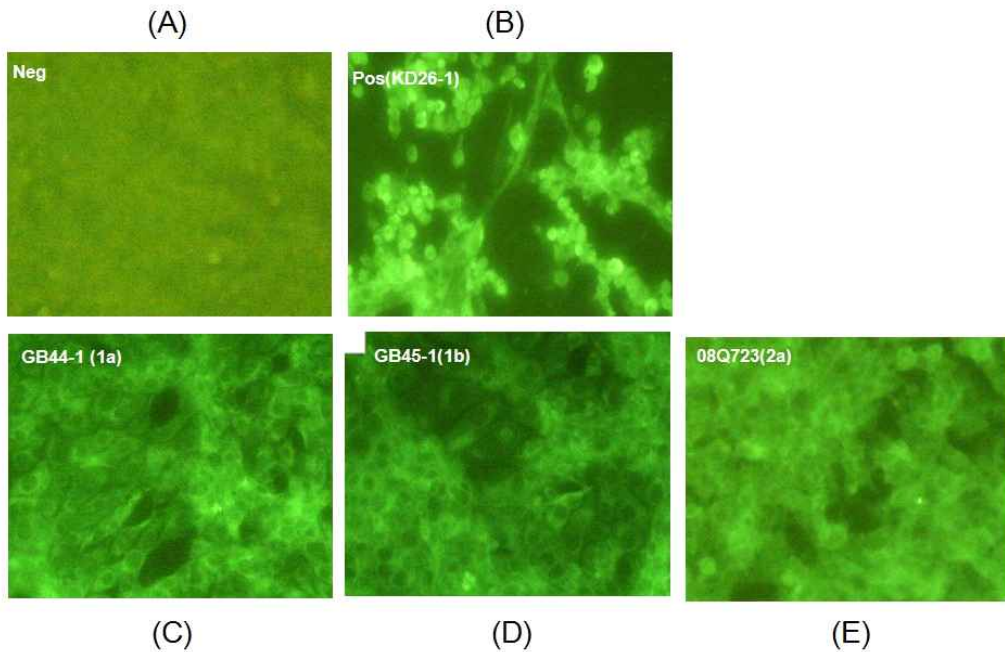


그림 36. MDBK세포주에서 증식한 국내분리 BVDV 유전형별 대표주를 BVDV 항혈청을 이용하여 면역 형광항체법으로 확인한 사진. (A) 음성대조군으로 미접종 MDBK 세포주, (B) 양성대조군으로 BVDV KD26-1주를 접종한 MDBK 세포주, (C) 국내분리 BVDV주 GB44-1주를 접종한 MDBK 세포주, (D) 국내분리 BVDV주 GB45-1주를 접종한 MDBK 세포주, (E) 국내분리 BVDV주 08Q723주를 접종한 MDBK 세포주.

나. 다클론항체(poly clonal antibody) 작성용 항원 제조

(1) 국내유행 유전형 BVDV 면역용 백신 제조

- 토끼 면역을 통해 BVD 간이 신속항원 키트 항원 capture용으로 적용할 BVDV에 대한 다클론항체를 확보하기 위한 확보된 3종 BVDV 백신을 제조하였다.
- 제조를 위해 선발된 1a형 GB44-1주, 1b형 GB45-1 및 2a형 08Q723주를 MDBK 세포주에서 배양하여 3종 바이러스 역가를 각각 측정하여 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml되게 조정하고 BEI 불활화제를 이용하여 불활화하였다. BEI (Binary Ethylene Imine) 처리방법은 2-bromoethylamine hydrobromide (2-BEA; Sigma)를 0.2N NaOH 용액에 0.1M이 되게

용해하여 37℃ 항온수조에서 1시간 처리하여 0.1M Binary Ethylene Imine (BEI)를 제조하여 4℃에 보관하여 사용하였다. 0.1 M BEI를 바이러스 배양액에 0.001M 되도록 첨가한 후 NaOH 용액으로 배양액을 pH 8.0으로 조정하여 37℃에서 15시간 교반하면서 불활화 시킨다. 불활화 후 멸균된 20% sodium thiosulfate로 최종농도가 2%되게 첨가하고 37℃에서 1시간 교반하여 BEI를 중화 시킨다. 필요에 따라 pH를 7.0~7.5로 조정하여 불활화된 바이러스 배양액을 MDBK 세포주에 접종하여 바이러스 증식 여부로 불활화 유무를 판단하였다.

- 각 3종 유전형에 대한 단종 시험백신과 3종 혼합 백신을 각각 제조하였다. 우선 단종 시험백신 10ml을 제조하기 위하여 불활화시킨 각 유전형 바이러스 상층액 항원 7ml과 면역 보조제 IMS1313 (Seppic, France) 3ml을 혼합하여 1a형, 1b형 및 2a형 각 단종 시험백신을 10ml 씩 조제하였다. 또한 유전형 3종 혼합 시험백신을 제조하기 위해서는 불활화시킨 바이러스 상층액 항원과 면역 보조제로서 IMS1313 (Seppic, France)의 비율을 7:3으로 하되 각 유전형별로 1a형, 1b형 및 2a형을 2ml, 2ml 및 3ml 씩 혼합하여 7ml을 준비하고 면역보조제로서 IMS1313 (Seppic, France)을 3ml 첨가 혼합하여 조제하였다. 유전형 중 2a형의 경우 나머지 1a 및 1b형이 유전형 1형인 점을 고려하여 1ml을 추가하여 3ml을 첨가하였다.
- 제작된 백신은 항체를 만드는데 사용하기 위하여 제1세부 과제팀에 전달 하였다.

제 2 절 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 유효성 평가

1. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 유효성 평가

제1세부 과제를 통해 제작된 키트에 대해 음성의 소 혈청에 양성 시료를 연속 희석 하는 spiking 방법을 통해 virus titer에 따른 반응성을 확인하였다. 소바이러스설사병(BVD) 바이러스 항원 진단을 위한 양성 검액을 신속진단키트와

반응 시켰을 때 검사선의 변화를 보면 virus titer 10^7 부터 $10^{6.4}$ 역가에서는 양성 반응을, $10^{6.1}$ 역가 이하에서는 음성으로 나타났다 (표 11). 따라서, 진단범위는 바이러스 역가 $10^{6.4}$ 까지로 확인 되었다. RT-PCR 기법을 사용할 경우 생 바이러스 백신 내에 존재하는 BVDV를 검출하기 위한 한계는 $10^{2.5}$ - 10^3 TCID₅₀/ml 로 보고 된것과 비교하면 민감도가 떨어지는 것으로 나타났다⁽²⁴⁾. 민감도의 개선을 위해서 기존의 항원-금 접합체를 이용한 Immunochromatography 에서 확인한 결과를 바탕으로 자성 나노입자(Magnetic nano- particle) 접합체를 사용하여 Immunochromatography를 수행해서 그 결과를 비교, 분석하는 추가 실험이 필요하다.

표 11. BVDV 양성시료 역가별 시험 결과

| No | 2-fold dilution | Virus Titer (TCID ₅₀ /ml) | SensPERT 결과 |
|----|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| 1 | 1 | 10^7 | + |
| 2 | 1/2 | $10^{6.7}$ | + |
| 3 | 1/4 | $10^{6.4}$ | + |
| 4 | 1/8 | $10^{6.1}$ | - |
| 5 | 1/16 | $10^{5.8}$ | - |
| 6 | 1/32 | $10^{5.5}$ | - |







| No | Virus titer (TCID ₅₀ /ml) | SensPERT 결과 |
|----|--------------------------------------|--|
| 1 | 10^7 |  |
| 2 | $10^{6.7}$ |  |
| 3 | $10^{6.4}$ |  |
| 4 | $10^{6.1}$ |  |
| 5 | $10^{5.8}$ |  |
| 6 | $10^{5.5}$ |  |

그림 37. BVDV 양성시료 역가별 시험 결과

2. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석

BVDV 항원 진단키트와 양성 검액의 반응을 육안으로 확인 후, 정량 분석 장치를 사용하여 정량 수치화 하고자 하였다. 본 과제를 통해 제작된 BVDV 항원 진단 키트의 경우 양성 검액에 대한 민감도가 낮아 정량 분석 장치를 사용한 정량값 역시 매우 낮게 측정 되었다. 그림 37과 표 11에서, 실험자의 육안상 양성 반응 구분 한계가 바이러스 titer가 $10^{6.4}$ 인 것으로 조사 되었지만, 표 12에서, 휴대용 분석 장치를 사용하여 정량값을 측정 하였을 때 각각의 희석된 바이러스 titer에서 Blank가 갖는 정량 값보다 높은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 기존의 육안에 의존해서 반응성을 확인하는 것보다는 정량 분석 장치를 사용 하는 것이 검출능이 높은 것으로 판단된다. 그러나, 바이러스 titer가 고역가 임에도 불구하고 키트상의 민감도가 떨어지고, 정량을 했을 때 값이 Blank 값과 유의하게 차이가 나 보이지는 않기 때문에, 본 과제를 통해 개발된 키트에 대해 추후 민감도를 높이는 개선 작업이 필요 할 것으로 사료된다. 민감도의 개선을 위해서 리더기의 성능 향상에 주력함과 동시에 정량분석의 비교 분석을 위해 시판되는 BVDV Ag ELISA kit(Prionics Swiss) 제품을 이용해서 자사 제품과 비교를 해보거나, Real Time RT-PCR 법을 통해서 항원을 정량화하여 정량분석 감도 및 분석 가능농도 범위를 넓히는 보완 작업이 필요하다.

표 12. BVDV 항원 신속키트에서 양성 검체의 역가별 반응값의 정량화

| No | Virus Titer (TCID ₅₀ /ml) | 광학측정값 (Intensity) | SensPERT 결과 |
|----|---|----------------------|----------------|
| 1 | 10^7 | 80.70 | + |
| 2 | $10^{6.7}$ | 43.43 | + |
| 3 | $10^{6.4}$ | 44.88 | + |
| 4 | $10^{6.1}$ | 40.16 | - |
| 5 | $10^{5.8}$ | 32.82 | - |
| 6 | $10^{5.5}$ | 28.65 | - |
| 7 | Blank | 15.60 | - |

3. 소바이러스설사병(BVD) 신속키트의 실험실내 유효성 평가

본 과제를 통해 제작된 신속진단키트 (SensPERT)의 특이도와 민감도를 평가하였다. 음성 검체는 음성 소혈액을 사용 하였으며, 양성인 경우 야외 검체 확보의 어려움으로 인하여 음성 소혈액에 BVDV를 spiking 하여 사용 하였다. 양성 20개의 검체와 음성 20 개의 검체를 이용하여 SensPERT의 특이도와 민감도를 평가하였다.

표 13. BVDV 항원 신속키트의 특이도와 민감도

| 구 분 | 바이러스스파이킹 | | |
|----------|----------|--------|----|
| | 양성 | 음성 | 합계 |
| SensPERT | | | |
| 양성 | 18(TP) | 0(FP) | 18 |
| 음성 | 2(FN) | 20(TN) | 22 |
| 합계 | 20 | 20 | 40 |
| 민감도 | | 90% | |
| 특이도 | | 100% | |

TP: True positive, FP: False positive, FN: False negative, TN: True negative

제 3 절 광학 리더기의 범용성 테스트

본 과제와는 별개로 다른 질병에 대한 3종의 신속진단키트를 사용하여 광학 리더기의 범용성 테스트를 수행 하였다. 범용성 테스트에 사용된 키트는 고양이 류케미아 바이러스(FeLV) 항원 신속진단키트, 개 로타 바이러스 (Rota virus) 항원 신속진단키트, 그리고 범백혈구감소증 (Feline Panleukopenia virus, FPV) 항원 신속키트 이다. 특히나, 리더기를 사용하여 정량을 하기 위해서, 고양이 류케미아 바이러스 항원 신속진단키트를 위한 양성 검액으로는 FeLV의 구조 단백질인 gag(p27)에 대한 재조합 항원 (1 mg/ml)을 사용하였으며, 개 로타 바이러스 항원 신속진단키트를 위해서는 로타 바이러스 배양액 (10^5 TCID₅₀/ml)을 사용 하였다.

1. 류케미아 바이러스 (FeLV) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석

류케미아 바이러스 (FeLV) 신속진단키트에 대해 이미 알고 있는 양성 표준 검체의 농도 (1mg/ml)를 표 13과 같이 2 배씩 희석하여 키트와 반응 시킨 뒤 광학 리더기를 사용하여 민감도 값을 정량 하였다. 광학 리더기로 정량한 결과 류케미아 바이러스 (FeLV) 신속진단키트의 검출 한계는 500ng/ml 로 확인 되었다.

이와 같이 정량된 값을 가지고 표준 곡선 (Standard curve)를 작성 하였으며, 이를 기준으로 unknown sample에 대한 역가값을 추정할 수 있었다 (그림 38). 예를 들어 그림 38에서 계산된, 4차 방정식 표준 곡선에 대해 unknown sample의 정량값인 intensity가 1000일 때, 항원 역가는 1/900 희석 구간에 있으며, 이때 항원의 반응농도는 약 48 ng인 것을 알 수가 있다. 그러나, 이러한 역가값의 추정은 실제 바이러스 titer에 대한 정량값을 가지고 표준 곡선을 계산한 것이 아니기 때문에, 계산된 unknown sample의 역가값 추정치는 류케미아 바이러스 항원 실측치와 다를 수 있다. 그러나, 추후 실제 바이러스 titer별 정량 값과, 재조합 항원을 사용한 정량값을 비교하는 실험을 추가하여 결과 값을 비교함으로써 이와 같은 문제를 해결 할 방안이다.

표 14. 류케미아 바이러스 (FeLV) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석

| 번호 | Dilution factor | 반응농도 (ng/40ul) | 평균 정량값 | 표준편차 | 정성 판정 | 정량 판정 |
|----|-----------------|----------------|---------|--------|-------|-------|
| 1 | 1/62.5 | 640 | 2227.00 | 41.684 | 양성 | 양성 |
| 2 | 1/125 | 320 | 2243.44 | 75.087 | 양성 | 양성 |
| 3 | 1/250 | 160 | 2006.20 | 36.365 | 양성 | 양성 |
| 4 | 1/500 | 80 | 1496.70 | 72.119 | 양성 | 양성 |
| 5 | 1/1000 | 40 | 883.30 | 27.881 | 양성 | 양성 |
| 6 | 1/2000 | 20 | 380.60 | 16.807 | 양성 | 양성 |
| 7 | 1/4000 | 10 | 124.10 | 16.730 | 약양성 | 음성 |
| 8 | 1/8000 | 5 | 130.80 | 5.827 | 음성 | 음성 |

| | | | | | | |
|----|---------|-----|--------|--------|----|----|
| 9 | 1/16000 | 2.5 | 83.20 | 4.638 | 음성 | 음성 |
| 10 | 1/40000 | 1 | 77.00 | 12.754 | 음성 | 음성 |
| 11 | Blank | 0 | 110.90 | 10.723 | 음성 | 음성 |

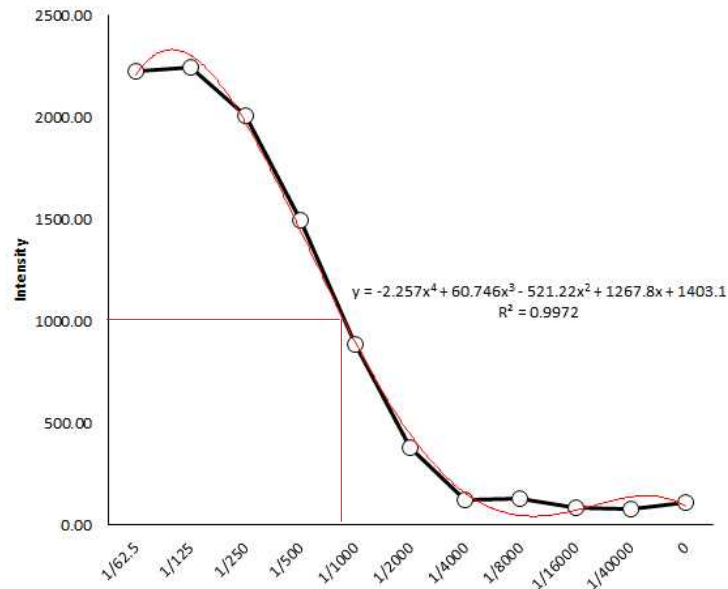


그림 38. 류케미아 바이러스 (FeLV) 신속키트의 항원 역가에 의한 표준 곡선

2. 로타 바이러스 (Rota virus) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석

로타 바이러스 titer가 10^6 TCID₅₀/ml 인 양성 검체를 사용하여 로타 바이러스 항원 신속진단키트의 항원 역가별 정량 분석을 수행 하였다. 표 14에서와 같이 로타 바이러스를 2배씩 희석하여, 키트와 반응 시킨 뒤 광학 리더기를 사용하여 민감도 값을 정량 하였다. 광학 리더기로 정량한 결과 로타 바이러스 (FeLV) 신속진단키트의 검출 한계는 10^3 TCID₅₀/ml로 확인 되었다.

이와 같이 정량된 값을 가지고 표준 곡선 (Standard curve)를 작성 하였으며, 이를 기준으로 unknown sample에 대한 역가값을 추정할 수 있었다 (그림 39). 예를 들어 그림 39에서 계산된, 4차 방정식 표준 곡선에 대해 unknown sample의 정량값인 intensity가 1000일 때, 항원 역가는 1/19 희석 구간에 있으며, 이

때 바이러스의 titer는 약 $10^{4.7}$ TCID₅₀/ml인 것을 알 수가 있다.

표 15. 로타 바이러스 (RotaV) 신속키트의 항원 역가별 정량 분석

| 번호 | Dilution factor | Virus titer (TCID ₅₀ /ml) | 평균 정량값 | 표준편차 | 정성 판정 | 정량 판정 |
|----|-----------------|--------------------------------------|---------|--------|-------|-------|
| 1 | 1/2 | $10^{5.7}$ | 1899.34 | 72.944 | 양성 | 양성 |
| 2 | 1/4 | $10^{5.4}$ | 1798.89 | 49.236 | 양성 | 양성 |
| 3 | 1/8 | $10^{5.1}$ | 1480.43 | 40.570 | 양성 | 양성 |
| 4 | 1/16 | $10^{4.8}$ | 1103.54 | 32.062 | 양성 | 양성 |
| 5 | 1/32 | $10^{4.5}$ | 674.67 | 24.468 | 양성 | 양성 |
| 6 | 1/64 | $10^{4.2}$ | 437.07 | 21.061 | 양성 | 양성 |
| 7 | 1/128 | $10^{3.9}$ | 250.15 | 10.535 | 양성 | 양성 |
| 8 | 1/256 | $10^{3.6}$ | 130.23 | 8.658 | 양성 | 양성 |
| 9 | 1/512 | $10^{3.3}$ | 70.91 | 6.063 | 양성 | 양성 |
| 10 | 1/1024 | $10^{3.0}$ | 46.84 | 6.257 | 약양성 | 양성 |
| 11 | 1/2048 | $10^{2.7}$ | 34.22 | 9.304 | 음성 | 음성 |
| 11 | Blank | 0 | 28.61 | 5.326 | 음성 | 음성 |

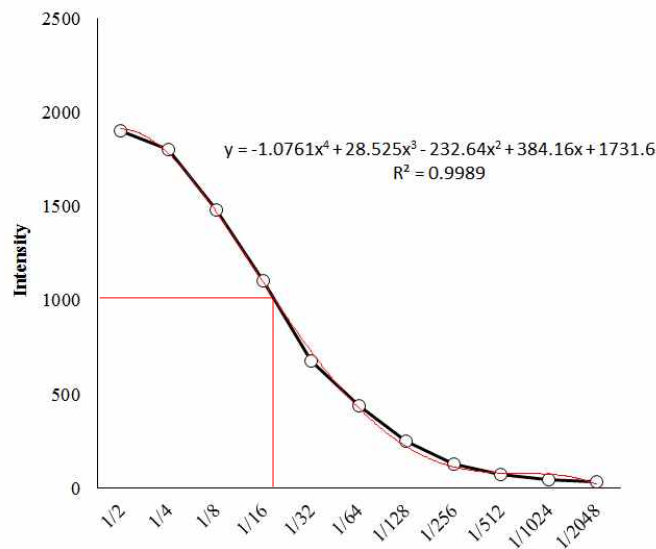


그림 39. 로타 바이러스 신속키트의 항원 역가에 의한 표준 곡선

3. 범백혈구감소증 (Feline Panleukopenia virus, FPV) 신속키트의 항원 역가별 정성 분석

상기 2종의 키트에서 광학 리더기를 이용한 항원 역가별 정량 분석 외에도 스트립의 정성분석에 적용 가능한지를 시험 하였다. 현재 본사에서 시판중인 고양이 범백혈구감소증 진단키트를 사용하여 양성 표준품에 의한 스트립 반응 결과를 기존과 같이 육안 분석을 통해 고 (High titer), 중 (Medium titer), 저 (Low titer) 로 구분 하였으며, 이때 스트립 상의 테스트 라인에 나타난 발색 정도를 리더기를 통해 수치화 하였다. 수치화된 값을 기준으로 unknown sample이 어느 titer 단계에 속하는 지를 구분 하였다.

표 15에서, 신속키트에 적용된 FPV 양성 표준품의 역가는 육안으로 고, 중, 저로 구분이 되었으며, 리더기를 통한 역가별 발색 정량값은, 고역가에서 420~700, 중역가에서 245~419, 저역가에서 50~244, 음성에서는 <50 으로 분포하는 것으로 측정되었다.

이러한 결과는 기존에 육안에 의지한 신속진단 키트의 정성 분석을 리더기를 이용한 정성분석으로 대체 가능하다는 것을 보여준다. 이를 통해 실험자의 주관적인 해석을 배제할 수 있으며, 분석이 완료된 다량의 키트에 대한 데이터의 자동 저장을 통해 데이터베이스화가 가능하다는 장점이 있다.

표 16. 범백혈구감소증 신속키트의 항원 역가별 정성 분석

| Panel | No | Test Line | | | |
|----------|--------------|----------------|----------|----------|----------|
| | | Visual Reading | Reader | | |
| | | | Value | Result | |
| Negative | 1 | Negative | 12 | Negative | |
| | 2 | Negative | 16 | Negative | |
| | 3 | Negative | 7 | Negative | |
| | 4 | Negative | 15 | Negative | |
| | 5 | Negative | 15 | Negative | |
| Positive | High titer | 1 | Positive | 481 | Positive |
| | | 2 | Positive | 537 | Positive |
| | | 3 | Positive | 552 | Positive |
| | | 4 | Positive | 579 | Positive |
| | | 5 | Positive | 529 | Positive |
| | Medium titer | 1 | Positive | 323 | Positive |
| | | 2 | Positive | 255 | Positive |
| | | 3 | Positive | 335 | Positive |
| | | 4 | Positive | 306 | Positive |
| | | 5 | Positive | 299 | Positive |
| | Low | 1 | Positive | 172 | Positive |

| | | | | | |
|--|-------|---|----------|-----|----------|
| | titer | 2 | Positive | 217 | Positive |
| | | 3 | Positive | 190 | Positive |
| | | 4 | Positive | 214 | Positive |
| | | 5 | Positive | 138 | Positive |

결론적으로, 3가지 다른 종류의 키트를 사용하여 과제를 통해 개발된 리더기의 범용성 테스트를 수행한 결과 기존의 육안에 의지한 정성분석법을 대체할 수 있는 것으로 확인 되었으며, 또한 리더기를 사용하여 표준양성시료에 대한 신속진단키트의 반응값을 정량적으로 측정할 수 있게 됨으로써, 이를 통하여 unknown 샘플이 포함하고 있는 측정 물질의 농도나 바이러스 titer와 같은 값들을 역으로 추정해 내는 것이 가능하다는 것을 보여 주었다. 그러나, 여전히 로트간의 변동 (Lot-to-lot variation), 제품간의 변동 (Product variability) 에 따라 리더의 정량값이 차이가 나며, 또는 정량을 하지 못하는 경우가 발생하기 때문에, 추후 이에 대한 표준화법이 나 장치적인 보완을 해야 할 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 평가의 착안점 |
|-------------------------------------|---|--|--|--|
| | | | | 착안사항 |
| 1차 연도 (2010.7 - 2011.6) | 제1세부: 베트올(주) | 소바이러스설사병 (BVD) 검출을 위한 항체 원료 개발 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 단클론 항체 및 다클론 항체 개발 ○ 소바이러스설사병 (BVD) 유효 항체의 선정 및 유효성 검증 ○ 포획항체 (검사선) 및 검출항체 금접합체 함량 결정 |
| | 제1협동: 비아이티밸류 | 1. 휴대용 정량 분석기 prototype 개발 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 이미지센싱 및 광학계 개발 및 성능테스트 ○ 외관 디자인 각 요소부 개발 (보드, 광학계, 기구부, 전원부) |
| | | 3. 휴대용 정량 분석기 S/W 개발 (노트북 base) | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 분석 S/W 알고리즘 작성 (노트북 이용) ○ 비전 S/W, 신호처리 알고리즘 ○ Calibration S/W 설계 |
| 제2협동: 농림수산검역 검사본부 | 소바이러스설사병 (BVD) 표준검체 확보 및 표준방법을 통한 역가기준설정 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 소바이러스설사병 표준바이러스 설정 및 확인 ○ 역가별 표준 패넬의 제조 및 기준역가 설정 ○ 야외 임상시료의 확보 및 표준 방법 적용 및 결과 도출 | |
| 2차 연도 (2011.7 - 2012.6) | 제1세부: 베트올(주) | 소바이러스설사병 (BVD) 항원 신속진단키트 개발 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 소바이러스설사병(BVD) 신속진단키트 프로토타입 제작 ○ 소바이러스설사병(BVD) 유효 항체 대량생산 시스템 구축 ○ 소바이러스설사병(BVD) 항원 신속진단키트의 대량생산 시스템 구축 |
| | 제1협동: 비아이티밸류 | 휴대용 정량 분석기 E/S 상용화 개발 (Engineering Sample) | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 임베디드 PCB 보드 개발 (PC 내장 개념) ○ 광학계 수정 및 보완 (감도, 재현성 향상) ○ 무선통신 기능 제작 |

| | | | |
|-------------------------|----------------------------|-----|--|
| | | | ○ 기구부 최종 설계 확정 |
| | 휴대용 정량 분석기 S/W 상용화 개발 | 100 | ○ 각 Unit 별 Driver 구동 S/W ○ 비전 S/W 보완 ○ Data 관리, management S/W 개발 |
| 제2협동: 농림수산검역 검사본부 | 소바이러스설사병 항원 신속진단키트의 유효성 평가 | 70 | ○ 소바이러스설사병(BVD) 신속진단키트 프로토타입의 실험실내 유효성 평가 ○ 소바이러스설사병(BVD) 신속진단키트의 야외가검물 실제 적용시험 |
| | 휴대용 진단시스템의 평가 | 100 | ○ 휴대용 진단시스템 적용 시 주관적 판독과의 차이 분석 ○ 타질병에 대한 검사키트에 대한 범용성 평가 |

제2절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

본 과제를 통하여 개발하고자 하였던 소바이러스설사병 항원 진단 신속키트의 경우 최종 목표에 도달 하지 못하였으나, 과제 수행중에 얻어진 결과물을 활용하여 개선 제품을 제작하여 소바이러스 설사병 방역사업에 활용 가능하도록 할 예정이며, 휴대용 모니터링 진단시스템의 경우 방역관리 체계 확립과 가축 질병의 조기 진단을 위한 모니터링 도구로써 활용 가능하다. 구체적인 기여도는 아래와 같다.

1. 기술적 측면

- 현장조기 진단 가능한 제품개발 기술력 확보: 농장에서 1차 스크리닝으로서 본 과제의 개발 제품을 검사를 선택할 경우 현장에서의 진단 결과 확보에 기반 한 진료방향 결정 및 잠복감염의 조기진단에 도움이 될 것임.
- 현장에서 신속정확하게 조기검진 및 제어시스템 확보: 질병 발생 위험지역 및 도축장 등 현장에서의 진단 결과를 확보함으로써 가축질병확산 방지
- 유효 항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보

- 신종 감염성 질병의 유행 가능성 및 분포 지역의 확대 등의 위험성이 매년 증가함에 따라 각 국가별 관리 체계 확립과 질병의 조기 진단을 위한 모니터링 도구로써 활용 가능.
- 인의(인체 의학) 및 수의(수의학) 분야의 진단제, 치료제 및 백신개발을 위한 중요한 도구로 활용 가능.
- 보다 많은 법정전염병으로 적용 가능한 기술 기반으로 사용 될 것이며, 이를 기반으로 보다 많은 타겟을 분석할 수 있는 차세대 단백질 바이오칩 개발에 활용 가능함.
- 향후 높은 민감도, 특이도, 재현성을 구현할 수 있는 biochip의 개발이 쉬워지며, 따라서 유전질환, 병원체의 진단과 분석 및 신약 개발 등의 중요한 기술로써 적용할 수 있게 될 것임. 따라서 biochip 연구개발에 있어서 새로운 기술의 도입으로 차세대 biochip의 기술개발의 발판을 새로이 만들 수 있으며 최종적으로 biomems 기술을 이용한 차세대 biochip (Lab-on-a-chip) 개발에 주요역할도 할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 경제·산업적 측면

- 기존 진단법과 비교 시 시간, 비용 절감 효과.
- 신시장 창출: Lateral-flow immunoassay 원리를 기반으로 한 소바이러스설사병 진단으로 10분 내 진단할 수 있는 제품이므로 신시장을 창출할 것으로 기대함. 이러한 효과는 국내뿐만 아니라 감염율이 심각하여 니드가 많은 해외시장으로의 수출이 가능하여 수출 증대 효과를 기대 할 수 있음.
- 기존의 본사에서 활용되고 있는 해외 수출망을 통하여 활발한 해외시장 진출이 타진되고 있음. 이로써 국내시장에서의 첫 번째 제품으로써 우위 확보가 가능하며, 스크리닝 시장을 본 과제에서 개발한 제품으로 대체함으로써 국내 기술 및 상품의 수출효과/수입대체효과를 기대할 수 있음.
- 결론적으로 새로운 신속진단키트로써의 신시장 창출이 가능해지고 기존의 진단법과 비교시 비용절감효과는 물론 세계시장으로 수출유도가 가능해지고 동시에 수입대체 효과를 기대할 수 있음.


제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 상품화 및 사업화 전략

- 국내 및 해외 저널에 논문게재
- 충분한 수의 임상시료확보를 통해 임상시험을 거쳐 제품 검증 후 국제수역사무국(OIE) 등록
- 농림수산검역검사본부에 제품의 품목허가
- 수출: 기존 95개국의 해외거래처 및 신규거래처 발굴을 통한 수출
- 내수: 국가 방역사업을 위한 국립수의과학검역원 납품추진
- 판매의 다각화 (자사브랜드, OEM, 반제품)을 통한 판매추진

2. 개발 시제품

A. 소바이러스설사병(BVD) 신속진단시스템의 시제품 개요

| 제품명 | 소바이러스설사병(BVD) 신속진단시스템 |
|-----|---|
| 용도 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 소에서 높은 유병율과 발병율 및 감염성을 보이고 있는 소바이러스설사병(BVD)의 항원을 정량 분석하는 진단시스템 ○ 사용되는 시료는 전혈, 혈청 및 혈장임 |
| 사양 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 진단 가능한 진단용 싱글디바이스, 검체희석액, 드롭퍼, 설명서/진단용 ○ 싱글디바이스를 분석할 수 있는 휴대용 범용 분석장치 |
| 방법 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 검체(전혈, 혈청 및 혈장)와 검체희석액을 검사키트에 점적한 5- 10분 내 항원의 존재유무와 정량을 범용분석장치를 이용하여 분석 |
| 시제품 |  |

B. 휴대용 정량 분석기의 시제품 개요

| 제품명 | 휴대용 정량 분석기 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--|--|----|----|--------------|---------|----------|-------------|-----|------------------------------------|---------------|-------------|---------|--------------------|---------------------|-----------------|-------------------|---------|---------------------|------------------------|---------------------|--|--------------------------|----------|-------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------|--------------------|-----|----|-------|
| 용도 | 환자나 동물의 혈액이나 소변등을 이용하여 신속진단 스트립 키트상에 생성되는 반응정도에 따라 Bar의 농도가 다르게 나오는데, 종전에는 사람의 눈에 의존하는 검사 방식을 대신하여, 광학시스템을 이용하여 객관적이며, 정량적인 검사가 필요한 키트의 진단검사를 위해 정량분석기가 필요하며, 최근에는 정량검사 뿐만 아니라 검사결과의 Digital 관리, 검역/방역 당국 및 병원등의 신속한 데이터 수집 및 모니터링을 위해 리더기의 용도가 확대되고 있음. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 사양 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center;">구분</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">사양</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Light Source</td> <td>고휘도 LED</td> </tr> <tr> <td>Detector</td> <td>CMOS Sensor</td> </tr> <tr> <td>LCD</td> <td>480x272 color touch TFT LCD (4.3')</td> </tr> <tr> <td>AC/DC Adapter</td> <td>Output : 9V</td> </tr> <tr> <td>Battery</td> <td>AA Type(1.5V) 6개사용</td> </tr> <tr> <td>Data input, display</td> <td>touch screen 방식</td> </tr> <tr> <td>Printer (Thermal)</td> <td>외장형, 옵션</td> </tr> <tr> <td>Barcode Reader (1D)</td> <td>외장형 (RS-22C interface)</td> </tr> <tr> <td>Host (PC) interface</td> <td>무선 LAN : 블루투스 (근거리 통신) 유선 : RS-232C</td> </tr> <tr> <td>Data chip (생산lot 정보 입력용)</td> <td>USB type</td> </tr> <tr> <td>Data Flash Memory</td> <td>128 MByte</td> </tr> <tr> <td>Program & Video Memory(RAM)</td> <td>256 Mbyte (DDR-RAM)</td> </tr> <tr> <td>Information storage</td> <td>10,000개</td> </tr> <tr> <td>Temperature Sensor</td> <td>내장됨</td> </tr> <tr> <td>OS</td> <td>WinCE</td> </tr> </tbody> </table> | | 구분 | 사양 | Light Source | 고휘도 LED | Detector | CMOS Sensor | LCD | 480x272 color touch TFT LCD (4.3') | AC/DC Adapter | Output : 9V | Battery | AA Type(1.5V) 6개사용 | Data input, display | touch screen 방식 | Printer (Thermal) | 외장형, 옵션 | Barcode Reader (1D) | 외장형 (RS-22C interface) | Host (PC) interface | 무선 LAN : 블루투스 (근거리 통신) 유선 : RS-232C | Data chip (생산lot 정보 입력용) | USB type | Data Flash Memory | 128 MByte | Program & Video Memory(RAM) | 256 Mbyte (DDR-RAM) | Information storage | 10,000개 | Temperature Sensor | 내장됨 | OS | WinCE |
| 구분 | 사양 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Light Source | 고휘도 LED | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Detector | CMOS Sensor | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LCD | 480x272 color touch TFT LCD (4.3') | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AC/DC Adapter | Output : 9V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Battery | AA Type(1.5V) 6개사용 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data input, display | touch screen 방식 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Printer (Thermal) | 외장형, 옵션 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Barcode Reader (1D) | 외장형 (RS-22C interface) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Host (PC) interface | 무선 LAN : 블루투스 (근거리 통신) 유선 : RS-232C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data chip (생산lot 정보 입력용) | USB type | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data Flash Memory | 128 MByte | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Program & Video Memory(RAM) | 256 Mbyte (DDR-RAM) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Information storage | 10,000개 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Temperature Sensor | 내장됨 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OS | WinCE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 방법 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 분석하고자하는 신속진단 키트를 Tray에 장착한후 리더기에 삽입한후 Color 터치 LCD상의 시작 버튼을 누르면 LED조명이 비취지며, 진단키트의 Control line과 Test line에 형성된 Bar의 Image Intensity(강도)를 CCD 이미지 센서로 Capture한후, Gray Level의 CCD pixel값으로 계산한다. ○ 계산된 pixel값은 미리 정해진 농도 환산식을 이용하여 최종적으로 반응 농도값을 계산하게 된다. 계산된 농도값은 검사하고자 하는 분석물질 (BVD, 심장질환, 약물검사등)에 따른 Cutoff값과 비교하여 positive 또는 negative로 표시하여 검사결과를 알려준다. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

○ 검사결과는 유선(RS-232C)이나 블루투스로 정해진 PC로 검사결과를 전송할 수 있다.

○ 초기메뉴 화면 포함 사진 (블루투스 설치됨)

시제품



C. 제품 설명서, 박스 및 파우치 이미지

a. 소바이러스설사병 항원 키트



Principles

SensPERT Bovine viral diarrhoea (BVD) test Kit is designed to detect the antigens of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in bovine whole blood, serum or plasma. Two antibodies in the kit specifically bind with different epitopes of the antigens. After being absorbed into the cellulose pad, the antigens of BVDV move and bind with gold-colloid complex of monoclonal anti-BVDV of the conjugate pad, forming Ab-Ag complex. This complex, then, forms Ab-Ag-Ab direct sandwich binding with the antibody of another anti-swine fever virus in the nitrocellulose membrane. The test results can appearance on Control and Test lines where the principles of immunochromatography are used.

Characteristics

- 1) One-step rapid test of BVDV antigens
- 2) Rapid test results between 5 ~ 10 minutes
- 3) Expensive equipment not required
- 4) Easy storage and maintenance
- 5) High-purity and high-quality materials of the test kit increase its sensitivity and specificity.

Materials (10 tests/kit)

- 1) Test ----- 10 units
- 2) Diluent (buffer) ----- 3ml x 1 unit
- 3) Disposable dropper for sample collection ----- 10 units

Composition

Specimen well (S : for dropping), Test line (T), and Control line (C) are marked on the device. Inside it, the strip is composed of sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane (test paper), and absorbent pad

Effect

Detection of BVDV antigens from bovine whole blood, serum, or plasma

Uses

1) Specimen

Bovine whole blood, serum or plasma

2) Test procedure

- a) When specimen and test kits are stored at cold circumstances (2~8 °C), put them at room temperature for 15~30 minutes before use.
- b) Take out a device from a pouch and place it on a horizontal surface.
- c) Using a dropper as a pipette, obtain the specimen and dispense 1 drop (40 µl) of the fluid into the specimen well(S).
- d) When the specimen is completely absorbed into the specimen well(S), drop about 2 drops (80µl) of buffer.
- e) Read the test results between 5 ~ 10 minutes.

◆ **Invalid results after 10 minutes.**

3) Interpretation of the results

A purple band should appear on the control line regardless of the test result. The presence of another band on the test line determines the result.

Control Line (C): The line should always appear regardless of the presence of the antigens of BVDV. If this line does not appear, the test should be considered invalid. This might be because of impure buffer or the lack of specimen. It should be tested again with another kit.

Test Line (T): The presence of antigens of BVDV determines the test line.

- 1) Negative: Control line only appears.



- 2) Positive: Both Test and Control lines appear.



- 3) Retesting

- a) Both Test and Control lines do not appear.



- b) Test line only appears.



4) Further examinations

This test is for primary screening only. Consult veterinarians for further necessary examinations to obtain clinical test results.

Precautions

- 1) Use for swine *in-vitro* diagnostic purposes only.
- 2) Use within 10 minutes after opening the pouch because the test kit is very sensitive to moisture and its effect may diminish.
- 3) Be careful of not touching the result window.
- 4) Every specimen should be used with different droppers.
- 5) For testing, the buffer included should be used.
- 6) Do not use specimen showing hemolysis or being contaminated with microbes, which may cause false positive or false negative result.
- 7) Deal with specimen carefully. They can deliver unknown virus or Infectious bacteria.
- 8) Use disposable gloves when you suspect the infection caused by specimen. And wash your hands later.
- 9) Dispose solid wastes after sterilizing them at 121°C for over 1 hour.

- 10) Do not use the kit when its pouch is torn, sealing is not good in shape or expiration date is passed.

Storage method and expiration date

The test kits stored at 2-30°C can be used for 24 months after manufacturing. **Do not keep them in a refrigerator.** However, if they are stored under cold circumstances, keep them at room temperature for 15-30 minutes before use.

Exchange

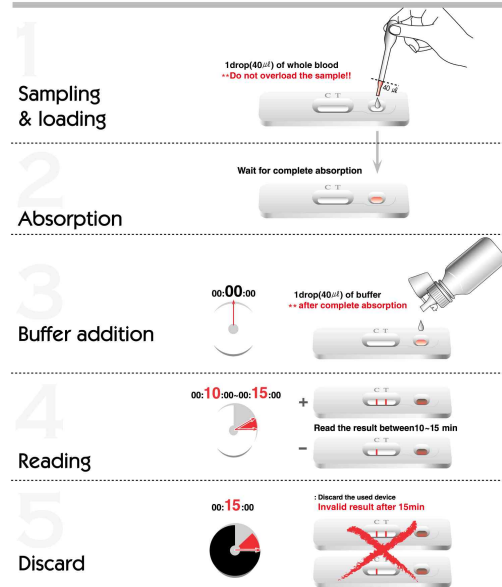
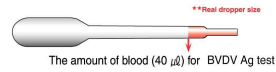
The test kits are manufactured under strict quality control system. Nevertheless, if they are deteriorate during delivery, ask our distributors for exchange.

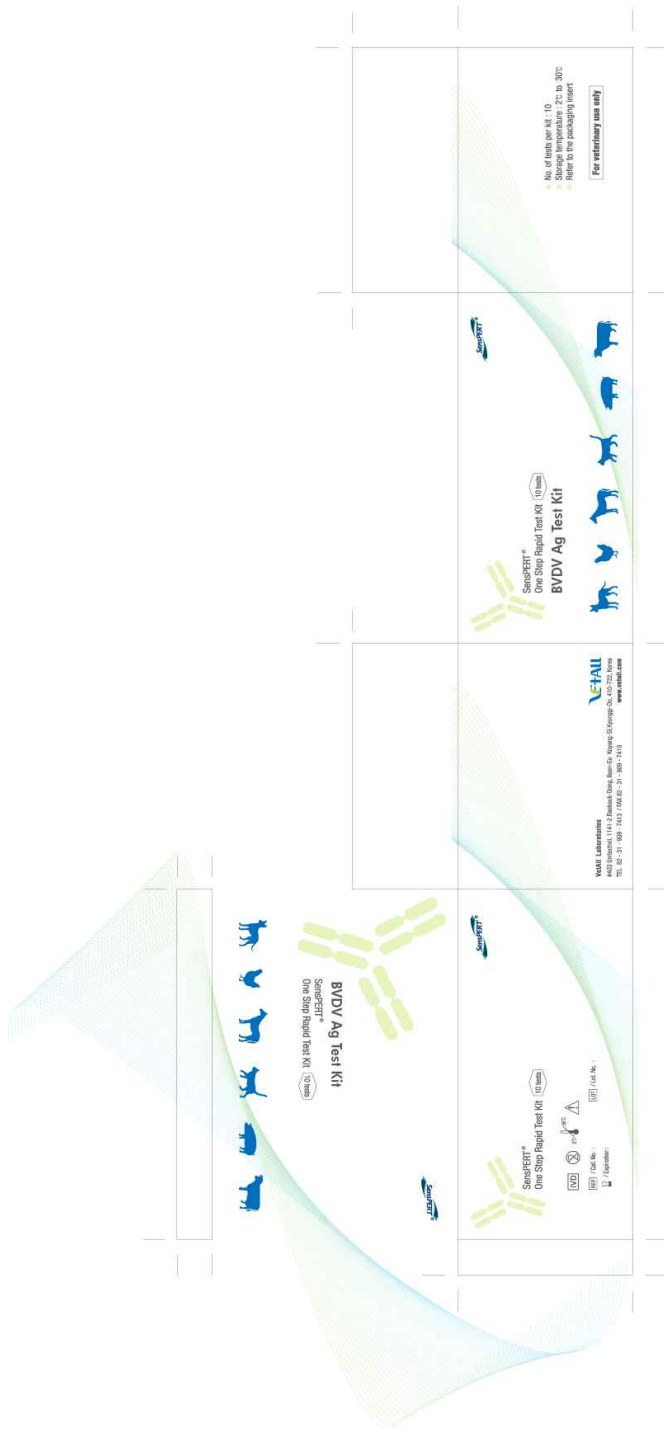
Liability

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of this product.



SensPERT®
Instruction for BVDV Ag test





BVDV Ag Test Kit

IN VITRO / Expiration: LOT / Lot. No. :

IN VITRO IN VITRO TEST DO NOT RE-USE STORE AT 2-30°C

1. Test Procedure

2. Interpretation of results

| | | | | | | | | | | |
|----------|--|----------|-----|----------|-----|---|---------|-----|--|-----|
| | <table style="border: none;"> <tr><td style="border: none;">Positive</td><td style="border: none; text-align: center;">C T</td></tr> <tr><td style="border: none;">Negative</td><td style="border: none; text-align: center;">C T</td></tr> </table> | Positive | C T | Negative | C T | <table style="border: none;"> <tr><td style="border: none;">Invalid</td><td style="border: none; text-align: center;">C T</td></tr> <tr><td style="border: none;"></td><td style="border: none; text-align: center;">C T</td></tr> </table> | Invalid | C T | | C T |
| Positive | C T | | | | | | | | | |
| Negative | C T | | | | | | | | | |
| Invalid | C T | | | | | | | | | |
| | C T | | | | | | | | | |

3. 특허출원

○ 베트올(주)

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2012.06.14
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(2575)
출원번호 10-2012-0063911 (접수번호 1-1-2012-0474752-51)
출원인명칭 베트올(주)(1-2007-009199-2)
대리인성명 유미특허법인(9-2001-100003-6)
발명자성명 이대은 양미영 이현식 김정미
발명의명칭 소바이러스성 설사병 바이러스의 탈지용 항체, 이를 이용한 항원 검출 방법, 및 이를 포함하는 탐지키트

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

○ 비아이티밸류(주)

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.08.09
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(17)
출원번호 10-2011-0079135 (접수번호 1-1-2011-0615341-84)
출원인성명 조원창(4-2008-030795-7)
대리인성명 리앤목 특허법인(9-2005-100002-8)
발명자성명 조원창
발명의명칭 진단 키트 현장 검사 장치

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

제 6 장 참고문헌

- [1] B. Ngom, Y. Guo, X. Wang, D. Bi, Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem* 397 1113-1135.

- [2] Warrener, P., M. C. Collett. Pestivirus NS3(p80) protein possess RNA helicase activity. *J. Virol* 69 (1995) 1720-1726.

- [3] Brock K. V., Redman D. R., Vickers M. L., Irvine N. E. Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J. Vet Diagn Invest* 3 (1991) 99-100.

- [4] Hou H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 11 (1995) 521-547.

- [5] Hou H., Baker J. C., Maes R. K. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J Vet Diagn Invest* 7 (1995) 321-326

- [6] Johannes A. K., Cees V. M., Gerard W., Grytsje S., Sjaak Q., Jan B., Lief R., Britta N. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet Microbiol* 64 (1999) 135-144

- [7] Eduardo F. F., Ruben O. D. Isolation of a Mutant MDBK Cell Line Resistant

to Bovine Viral Diarrhea Virus Infection Due to a Block in Viral Entry.
Virology 208 (1995) 565-575.

[8] J. F. Ridpath. S. R. Bolin. Differentiation of type 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. Mol. Cell. Probes 12 (1998) 101-106.

[9] www.es-e-gmbh.de

[10] www.matest.de

[11] www.e77.com

[12] Muller-Bardorff M., Sylven C., Gundars R., Jorgensen B., Collinson P. O., Waldenhofer U. Evaluation of a point-of-care system for quantitative determination of troponin T and myoglobin. Clin. Chem. Lab. Med. 38 (2000) 567-574.

[13] www.cholesteck.com

[14] www.unipath.com

[15] www.cozartgroup.com

[16] www.charm.com

[17] www.alexeter.com

[18] www.neogen.com

[19] www.tubi.com.tw/Uniscan_rap%20test%20reader.htm

- [20] www.skannex.com/how.html
- [21] Mahy B. W. J., Kangro H. O., Quantitation of virus. Virology methods manual. Washing DC: ASM press, (2000) 25-26
- [22] Hsiung G. D. Virus assay and neutralization test. Diagnostic virology. (1982) 25-34
- [23] Kohler, G., C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256 (1975) 495-497
- [24] Reu SY., Shin JH., Back SY., Kim JO., Min KI., Min BS., Kim BK., Kim DG., Park MK., Ahn MJ., Chea KS., Jung HS., Lee SH., Park SH. 세포배양 유래 생물약품 중 Bovine Viral Diarrhoea Virus 검출을 위한 RT-PCR, Real-Time RT-PCR 및 RT-PCR-ELISA 기법의 검출한계와 정량범위 평가. J. Bact Virol. 33 (2003) 161-168.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.