

119057-02

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
가축질병대응기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003447-01

화학발광을 이용한 조류인플루엔자  
바이러스 신속진단키트 개발

# 화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발

2021.04.09.

2021

주관연구기관 / 충남대학교  
협동연구기관 / (주)씨맥

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발”(개발기간 : 2019. 05. 27. ~ 2020. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 손영아 (인)  
협동연구기관명 : ㈜씨맥 (대표자) 박종택 (인)



주관연구책임자 : 박정은

협동연구책임자 : 박종택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119057-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.05.27. ~2020.12.31	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발			
연구책임자	박정은	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:450,000천원 민간:150,000천원 계:600,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:450,000천원 민간:150,000천원 계:600,000천원
연구기관명 및 소속부서명	충남대학교 산학협력단			참여기업명 (주)씨맥	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 본 연구의 최종 목적은 고감도, 고특이성 (고병원성과 저병원성 감별), 정량화를 특징으로 하는 화학발광법을 기반으로 한 현장용 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트를 개발하는 것임.
- 이를 위해, 1) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 개발 및 최적화, 2) 조류인플루엔자바이러스 실시간진단을 위한 시료 전처리기술 개발, 3) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단기기 (검출키트 및 검출기) 개발 및 IoT 프로그램 개발 등의 세부 목표를 가지고 연구를 수행함.
- 대표성과
  - 특허출원 : 화학발광 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2020-0182437, 출원일자: 2020.12.23.)
  - 사업화 : 화학발광 검출용 진단기기 사업화 및 고용 (8명) 창출.

보고서 면수

81쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구의 최종 목적은 고감도, 고특이성 (고병원성과 저병원성 감별), 정량화를 특징으로 하는 화학발광법을 기반으로 한 현장용 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트를 개발하는 것임.</li> <li>○ 이를 위해, 1) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 개발 및 최적화, 2) 조류인플루엔자바이러스 실시간진단을 위한 시료 전처리기술 개발, 3) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단기기 (검출키트 및 검출기) 개발 및 IoT 프로그램 개발 등의 세부 목표를 가지고 연구를 수행하고자 함.</li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발</li> <li>- Intervirion fusion assay 반응조건 최적화</li> <li>- 현장용 검출키트 제작</li> <li>- 현장용 검출키트 측정감도 및 한계 검사</li> <li>- 고병원성 인플루엔자 감별진단용 키트 제작</li> <li>- 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작</li> <li>- 슈도바이러스를 이용한 감별진단 기술 검증</li> <li>- 기타 조류바이러스 및 분변샘플을 이용한 감별진단기술 검증</li> <li>- <u>관련 연구 성과</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 특허 출원 : 화학 발광 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2020-0182437, 출원일자:2020.12.23.), 화학 발광 기반의 코로나 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2021-0021142, 출원일자: 2021.02.17.)</li> <li>2) 논문 투고 : Differential diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus using nanoparticles expressing chemiluminescence</li> <li>3) 학술대회 발표 : 4건</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ <b>화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 시료전처리 기술 개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 감염시료 제작</li> <li>- 감염시료를 이용한 진단기술 검증</li> <li>- 동물시료 내 유효 오염물 탐색</li> <li>- 감염시료 전처리 기술 개발</li> <li>- 임상시료 확보</li> <li>- 시제품 성능 검사</li> <li>- 정량화 프로그램 검증</li> <li>- <u>관련 연구 성과</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 인력양성 : 석사과정 2명</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ <b>화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 제작</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 화학발광 진단기기 광학모듈 개발</li> <li>- 화학발광 진단기기 하드웨어 개발</li> <li>- 화학발광 진단기기 펌웨어/Touch panel LCD 개발</li> <li>- 시제품 제작 및 성능평가</li> <li>- 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경제성 분석 및 판로확보</li> <li>- <u>관련 연구 성과</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 사업화 : 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단용 시제품 2건</li> <li>2) 고용창출 : 8명</li> </ol> </li> </ul>				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>현장용 조류인플루엔자 확정 진단 가능:</b> 매년 겨울철에 양계농장에서 발생하는 조류인플루엔자바이러스를 신속하고 정확하게 진단하여 질병의 확산을 최소화함으로써 조류인플루엔자바이러스에 대한 국가 방역체계를 확립함.</li> <li>○ <b>농가에서의 고병원성 조류인플루엔자 감별진단 및 확산 방지에 활용 가능:</b> 현장에서 고병원성 조류인플루엔자를 진단함으로써 신속하게 질병의 확산을 방지하여 가금류의 살처분 등에 소요되는 직접적·간접적인 경제적 피해를 최소화하고 인수공통전염병의 확산을 방지함.</li> <li>○ <b>정량적 조류인플루엔자바이러스 진단법:</b> 현재까지 개발된 현장용 진단 기기는 정성적 또는 반정량적인 측정만이 가능하여 음성과 양성 판정만 이루어졌음. 본 연구과제를 통해 개발되는 진단기술에서 사용되는 화학발광은 발색 및 형광에 비해 정량적인 측정이 매우 탁월하다는 장점을 가지고 있으며 실험실내 연구로 수립된 정량그래프와 접목하여 정량적 진단결과를 생산해 낼 수 있음. 이는 추가적으로 요구되는 정밀진단의 필요성을 제거함으로써 신속한 방역 및 진단비용의 감소에 이바지할 수 있음.</li> <li>○ <b>다른 동물질병 진단 분야:</b> 본 연구기술은 협막을 가지는 바이러스의 감염시 발생하는 현상을 이용한 것으로 반응물질의 표면에 발현하는 세포수용체의 변경만으로 새로운 동물질병 진단에 이용이 가능함. 동일한 원리로 코로나바이러스 진단시스템을 구축하기 위한 추가연구를 진행 중임.</li> <li>○ <b>화학발광 기반 POCT 진단 분야:</b> 화학발광을 기반으로 한 POCT 진단 분야는 아직 개척되지 않은 신기술로 고감도, 정량적, 저비용이라는 특징을 가지고 있으며 동물진단시장을 포함하여 다양한 체외진단시장에 적용이 가능함.</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>조류인플루엔자</p>	<p>현장진단</p>	<p>감별진단</p>	<p>모니터링</p>	<p>화학발광</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Avian influenza</p>	<p>On-site diagnosis</p>	<p>Differential diagnosis</p>	<p>Monitoring</p>	<p>Chemiluminescence</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	20
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	67
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	69
붙임. 참고 문헌 .....	71

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

### 가. 최종목표

- 화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 및 시료 전처리기술 개발
  - 화학발광 기반 고병원성/저병원성 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 확보
  - 화학발광 검출을 위한 동물 시료 전처리 기술 확보 및 기구 제작
- 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 (검출키트 및 검출기) 제작
  - 2종 (인플루엔자용, 고/저병원성 감별용) 검출키트 제작
  - 화학발광 검출기 제작
  - 정량화 펌웨어 및 IoT 연계 프로그램 제작

### 나. 세부목표

- 주요 기능
  - 미량 조류인플루엔자바이러스 진단 기능
  - 현장용 조류인플루엔자바이러스 진단 기능
  - 고감도 조류인플루엔자바이러스 진단 기능
  - 고병원성 조류인플루엔자바이러스 감별 진단 기능
  - 인체 및 돼지 인플루엔자바이러스 진단 기능
- 주요 성능치
  - 신속성: 15분 이내
  - 특이성: 고병원성 및 저병원성 조류인플루엔자바이러스 감별 진단
  - 정확성 및 재연성: 95% 이상
  - 검출한계: 100 EID50/ml
  - 시료범위: nasal swab, fecal swab, feces, serum
  - 이용시간: 100회 측정
  - 농가에서 직접 활용될 수 있도록 단순한 기구로 제작
- 핵심기술
  - 화학발광기반 조류인플루엔자바이러스 진단기술 (세계 최초)
  - Dual split reporter기반 고병원성 조류인플루엔자바이러스 감별기술 (세계 최초)
  - 화학발광 검출용 동물 시료 전처리 기술 (세계 최초)
  - 현장용 화학발광 검출기 (국내 2위)



○ 적용범위

- 양계농가 및 철새군집 내 조류인플루엔자바이러스 감염의 진단
- 고병원성 조류인플루엔자바이러스 감염의 진단 및 신속한 방역에 활용 가능
- 사람 인플루엔자바이러스 감염의 진단

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 가. 연구개발 개요

화학발광법을 기반으로 고감도, 고특이성, 정량적 신호를 생산 및 측정할 수 있는 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발.

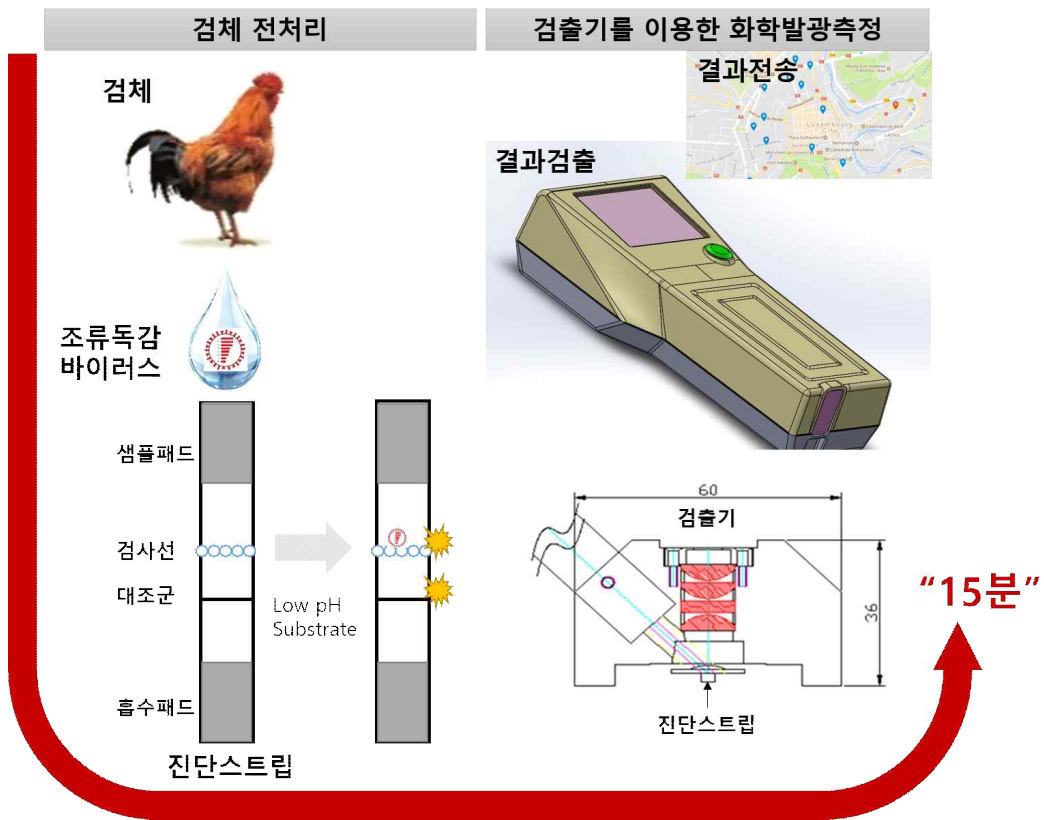


그림 2 연구개발 개요

### 나. 핵심기술

#### (1) 고병원성 조류인플루엔자바이러스 감별기술

- 개발기술 : 조류인플루엔자바이러스의 감염을 위해서는 단백질해효소에 의한 표면 단백질의 절단과 low pH에 의한 구조적 변화가 필요함. 저병원성 인플루엔자바이러스의 경우 이 두 가지 요소를 모두 필요로 하지만, 바이러스 생산세포 내에서 표

면단백질의 절단이 이루어지는 고병원성 인플루엔자바이러스의 경우 low pH만으로도 감염을 일으킬 수 있으며 이러한 특성을 이용하여 고병원성 조류인플루엔자 바이러스를 감별진단 할 수 있는 원천기술임.

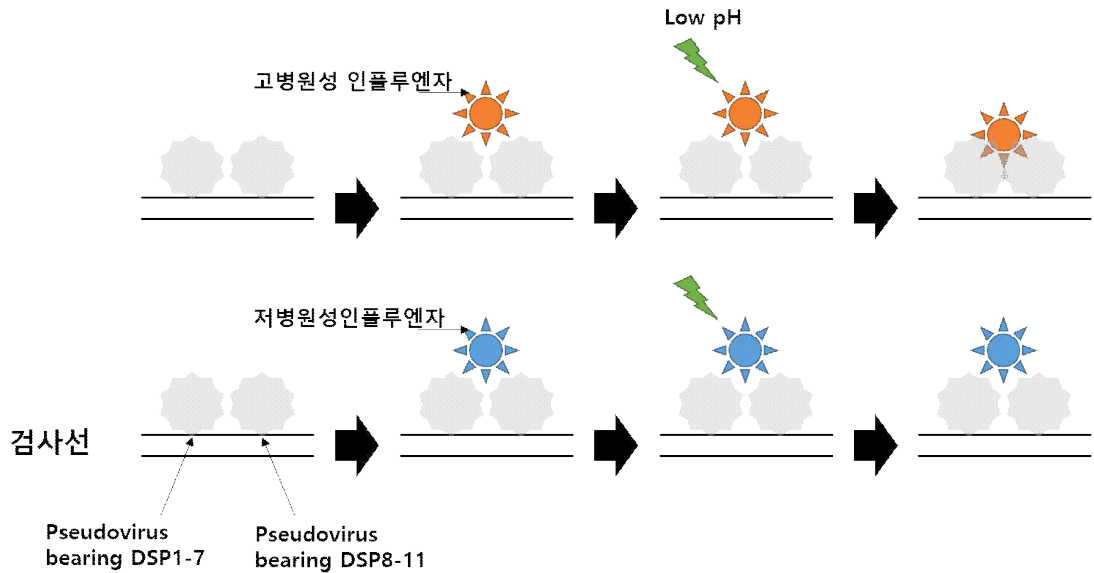


그림 3 조류인플루엔자 감별진단 기술

○ 본 기술개발의 중요성

- 고병원성 조류인플루엔자의 신속한 진단은 국가방역체계 확립, 양계농가의 경제적 안정, pandemic 인플루엔자 발생 억제에 측면에서 매우 중요한 의미를 지님.
- 기존의 조류인플루엔자 간이진단키트는 항원-항체 반응을 기반으로 하고 있음. 항원-항체 반응을 이용한 진단기술은 신속하게 일어나는 장점을 가지고 있지만, 고병원성과 저병원성 조류인플루엔자바이러스를 모두 인식하므로 감별진단이 불가능함. 감별진단이 가능하다 하더라도 17종에 달하는 혈청형의 인플루엔자를 특이적으로 인식하는 항체를 각각 확보해야 된다는 어려움이 있음.
- 현재 고병원성 인플루엔자바이러스의 진단을 위해서는 Sequencing, 동물 및 세포에서의 병원성 확인 등으로 이루어지며 진단에 시간 및 인력이 많이 소요되어 질병확산을 야기하고 있음.

(2) 화학발광기반 진단기술

- 개발기술 : 조류인플루엔자바이러스의 수용체인 sialic acid를 표면에 발현하며 내부에는 renille luciferase의 N terminal과 C terminal을 각각 발현하는 nanoparticle 이 조류인플루엔자바이러스의 존재 하에 융합되고 renille luciferase에 의해 화학발광을 일으키는 원리를 이용함.

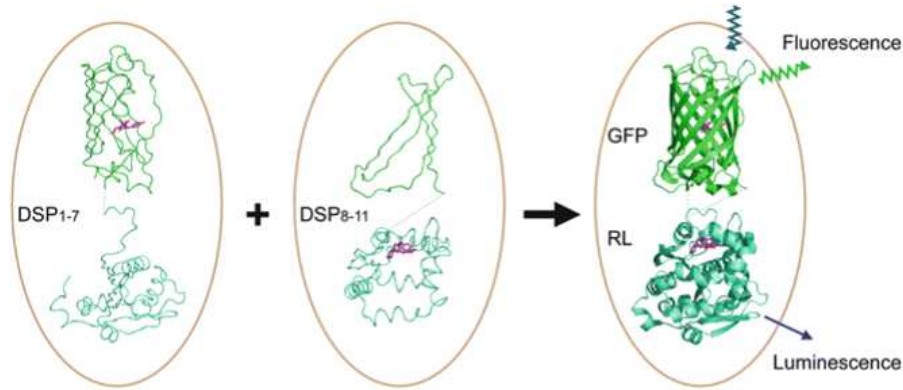


그림 4 Dual split luciferase system

- 기술의 독창성 : 현재까지 진단시장에서 사용되고 있는 진단기술은 발색과 형광을 기반으로 하고 있음. 최근 화학발광을 기반으로 한 진단법 개발을 위한 연구가 진행 중이며, “Pathfast”라는 패혈증 진단기기 1종이 상용화에 들어갔음. 즉, 화학발광을 이용한 진단기기 시장은 아직 개척되지 않은 신종기술로 연구 및 개발이 요구됨.
  - 화학발광 신속진단법의 장점
    - 고감도: 화학발광 신속진단 키트는 기존의 변색을 통한 진단법에 비해 1000배 이상의 검출 한계를 가질 수 있음
    - 저비용 (검출기): 형광을 통한 진단법과 달리 광원부를 필요로 하지 않아 저비용으로 실용화가 가능함.
    - 정량화: 변색이나 형광을 통한 검사는 정량이 비교적 어려우며 정성적인 진단법으로 알려져 있으며, 이는 감염의 “확진”을 불가능하게 함.
    - 시료 내 오염물에 의한 간섭현상을 거의 받지 않음.
  - 화학발광 신속진단법의 단점 및 대응방안
    - 형광 dye에 비해 화학발광을 일으키는 dye가 비교적 고가이기 때문에 개발에 어려움이 있었음 ---> 본 연구과제에서는 진단기술에서 합성되는 효소에 의해 자체적으로 발생하는 화학발광을 측정함으로써 화학발광 dye의 구입에서 발생할 수 있는 재료비를 최소화함.
    - 화학발광신호는 발색이나 형광에 비해 반응이 비교적 빠르게 소멸되기 때문에 재시험에 대한 한계점을 가지고 있음. ---> 본 연구과제에서는 이를 극복하기 위해 화학발광신호와 형광을 동시에 발생시킬 수 있는 시스템을 사용함.
- (3) 화학발광 검출을 위한 시료 전처리 기술
- 개발기술 : 시료 내에 존재하며 검사의 민감도를 저하시킬 수 있는 가능성이 있는 오염물을 탐색하고 효과적으로 제거할 수 있는 기구를 제작함.

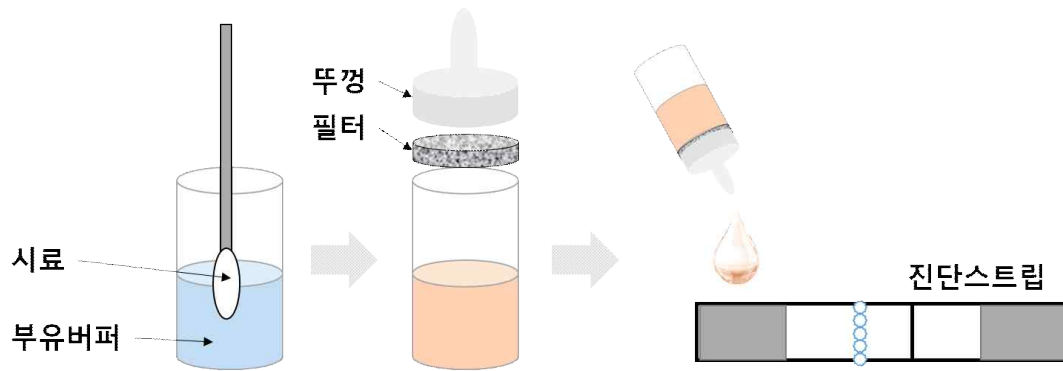


그림 5 시료 전처리 기술

○ 기술개발의 중요성

- 현장형 간이진단키트 사용시 포함될 수 있는 시료내의 오염물 (분변, 혈액의 용혈, dell debris 등) 은 검사의 민감도와 특이도를 저하시킴. 효과적인 시료 전처리 기술 및 기구의 탐색은 현장형 간이진단키트의 실용화에 반드시 요구됨.
- 화학발광을 기반으로 한 현장용 동물 진단키트는 본 연구과제를 통하여 최초로 시도되는 것으로 의료 시료에 비해 오염도가 높은 동물 시료 내에 포함되어 오염물에 대한 탐색이 필요함.

(4) 현장용 화학발광 검출기 개발 기술

○ 개발기술 : 안정적으로 renille luciferase를 검출할 수 있는 portable 검출기를 제작함.

○ 기술개발의 중요성

- 현장용 검출기 개발 기술은 이미 상당한 수준에 와 있으나, 화학발광의 특성에 기반하여 보다 안전하고 민감하게 신호를 검출할 수 있는 검출기 개발이 요구됨.
- 양계농가 및 철새서식지 등에서의 상용화를 위해서는 저출력으로 장시간 사용할 수 있는 간이 기기가 요구되며 상품시장을 고려한 기존기술의 최적화가 요구됨.

### 1-3. 연구개발 범위

(1) 주관연구기관

○ 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발

- Receptor (sialic acid) bearing particle 제작: 293T 세포에 S15-DSP1-8과 S15-DSP9-12를 encoding 하는 plasmid, HIV core protein을 encoding 하는 plasmid, 단백질해효소인 TMPRSS2를 encoding 하는 plasmid를 co-transfection

합. Transfection 48시간 후 세포 상층액을 harvest하고 상층액 내 virus particle 을 ultracentrifugation을 통해 농축함. 농축된 virus particle의 농도를 P24 ELISA를 통해 측정함.

- 검역원으로부터 분양받은 H7N9 저병원성 조류인플루엔자바이러스를 유정란에서 배양하여 assay 평가를 위한 시료로 사용함.
- DSP1-8 및 DSP9-12을 각각 발현하는 pseudotyped virus particle를 H7N9 influenza virus와 다양한 조성 (비율), 시간, 온도 하에서 반응시킴. 반응은 96-well microplate에서 수행함. 반응물에 pH5.0의 buffer를 가하여 바이러스 사이의 fusion을 일으킴. Renilla luciferase assay를 통해 fusion 의 정도를 확인함.

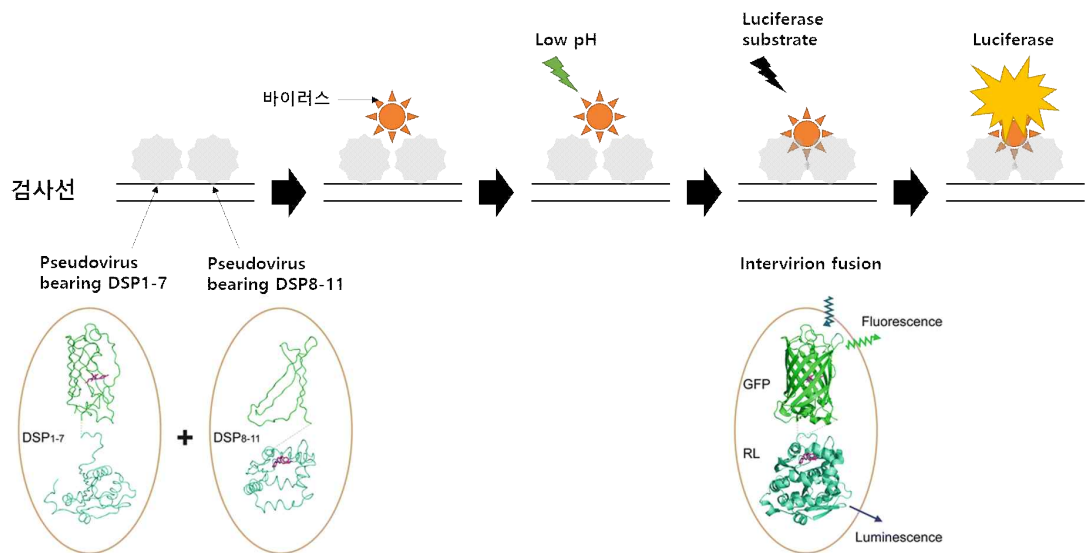


그림 6 화학발광기반 실시간 조류인플루엔자 진단 기술

○ 반응조건 최적화

- 반응 조성 (비율), 시간, 온도, 양에 따른 반응의 세기를 비교 분석함으로써 진단에 사용될 수 있는 최적의 반응 조성을 확립하고, 최소 용량 및 시간을 선정함. 온도에 따른 반응 (음/양성)의 차이를 모니터링함.
- 현장용 검출키트 제작에 앞서, Dual split reporter를 이용한 intervirion fusion assay에 대한 충분한 사전데이터 확보를 위해, 3종 이상의 인플루엔자바이러스 및 닭의 호흡기에 감염을 일으킬 수 있는 바이러스 (NDV, IBV, AMPV)를 이용한 선행연구를 수행.

○ 현장용 검출키트 제작

- 진단스트립 제작을 위해서 Nitrocellulose, Nylon, Polyvinylidene fluoride (PVDF) 등의 membrane를 사용하여 가장 효과적으로 pseudotyped virus particle을 지지할 수 있는 membrane을 선정함. 각 membrane 에서의 pseudotyped virus particle의 안정도와 지지도는 western blot과 luciferase assay를 이용하여 수행함.
- 선정된 membrane의 한쪽 끝에 absorbent pad를 장착하고, assay buffer를 흘려

주면서 가장 효과적으로 buffer change를 유도하는 absorbent pad의 위치와 두께를 선정함.

- Control line과 test line에 각각 renille luciferase와 pseudotyped virus particle을 탑재한 뒤, assay buffer를 흘려주어 반응이 나타나는지를 western blot 및 luciferase assay를 통해 확인함.
- 최적의 반응을 보이는 반응용량 및 반응조건을 결정함.

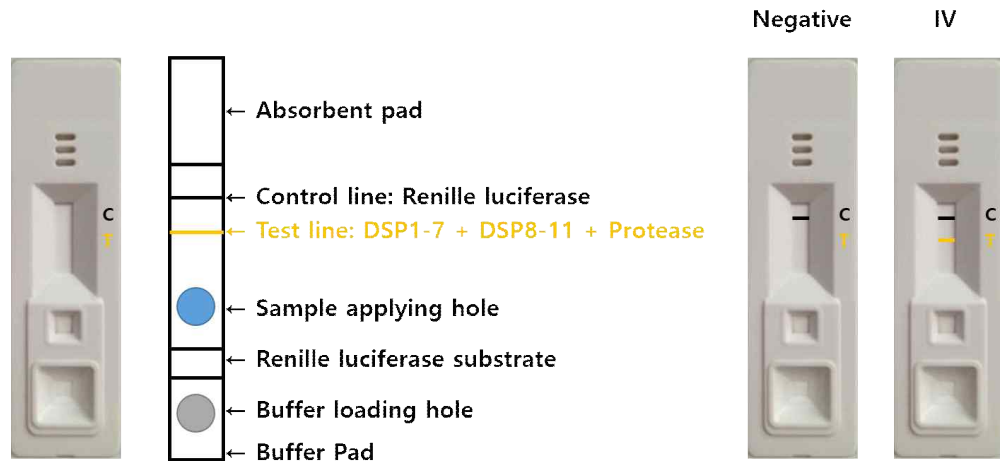


그림 7 현장용 검출키트

○ 현장용 검출키트의 측정 감도 및 한계 검사

- 진단기술의 측정감도와 한계를 검사하기 H7N9 influenza virus를 다양한 농도로 단계 희석한 뒤, 개발된 현장용 진단기술 및 현재 사용 중인 진단법들 (ELISA, real-time PCR, Virus titration)에 의해서 측정함.
- 진단기술의 결과법을 정량적으로 이용하기 위해, 기존의 진단법들에 의해 측정된 virus titer와 진단결과 사이의 관계를 그래프로 나타내어 결과의 정량화를 위한 펌웨어 제작의 기초 자료를 마련함.

○ 고병원성 인플루엔자 감별진단용 test kit 제작

- 고병원성 인플루엔자바이러스는 저병원성 인플루엔자바이러스와 달리 바이러스의 감염을 매개하는 HA 단백질이 이미 절단된 형태로 발현되며 세포에 감염하기 위해 세포내 단백질분해효소의 작용을 필요로 하지 않음.
- 고병원성 인플루엔자와 저병원성 인플루엔자바이러스의 이러한 차이점을 이용하여 감별진단 키트를 제작할 예정임.
- 단백질분해효소를 필요로 하지 않는 고병원성 인플루엔자바이러스를 검출하기 위해, 단백질분해효소인 TMPRSS2는 발현하지 않으면서, 인플루엔자바이러스의 수용체인 sialic acid와 dual split report 만을 발현하는 pseudotyped virus particle을 제작함.
- 고병원성 인플루엔자바이러스를 검출하기 위한 “test line for high pathogenic influenza virus (TH)”에는 단백질분해효소를 포함하지 않는 pseudotyped virus particle를, 고병원성과 저병원성 인플루엔자바이러스 모두를 검출할 수 있는

“test line for low pathogenic influenza virus (TL)”에는 단백질효소를 검출할 수 있는 pseudotyped virus particle를 코팅하여 검출키트 (스트립)을 제작함.

- 고병원성 인플루엔자바이러스의 경우, TH, TL, C에서 저병원성 인플루엔자바이러스의 경우 TL, C에서 양성반응을 보임.

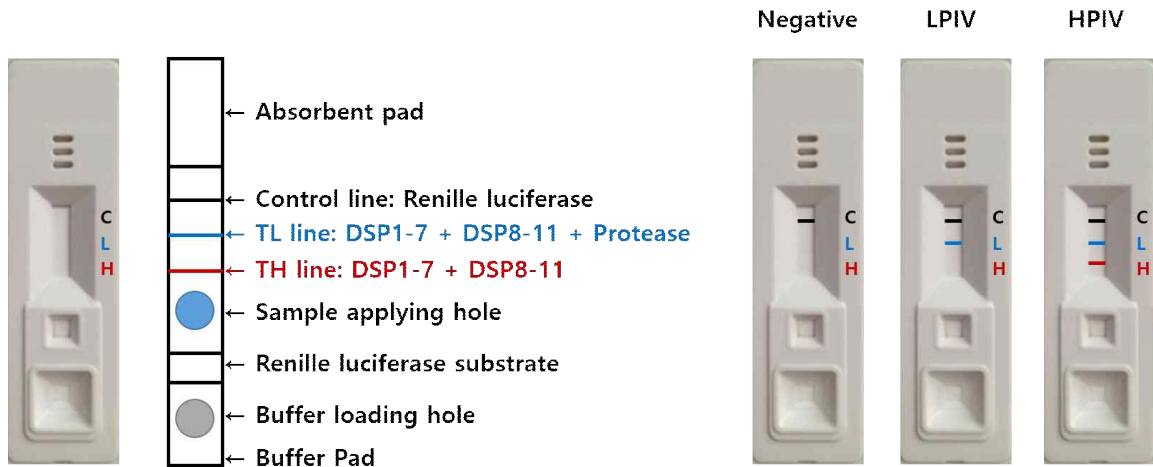


그림 8 고병원성 인플루엔자 감별진단용 키트

○ 고병원성 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작

- BSL3 pathogen인 high pathogenic influenza는 일반 실험실에서 사용이 어렵기 때문에 pseudotyped virus를 이용하여 test kit에 대한 검증을 수행할 예정이다.

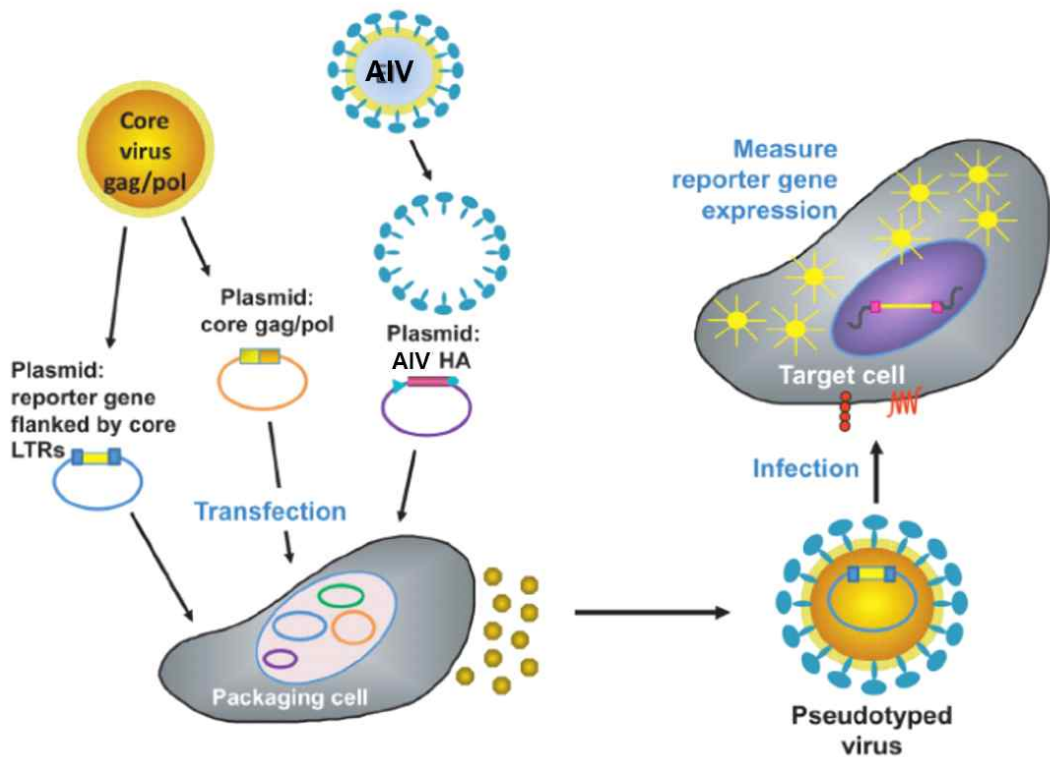


그림 9 슈도 인플루엔자 제작 과정

- Pseudotyped high pathogenic influenza virus 제작을 위해, 293T 세포에 HA5와 high pathogenic HA7를 encoding 하는 plasmid를 neuraminidase 및 HIV core protein을 encoding하는 plasmid와 함께 co-transfection함.
  - Pseudotyped low pathogenic influenza virus 제작을 위해, 293T 세포에 low pathogenic HA7, HA9 를 encoding 하는 plasmid를 HIV core protein을 encoding하는 plasmid와 함께 co-transfection함.
  - Transfection 48시간 후 세포 상층액을 harvest하고 상층액 내 virus particle을 ultracentrifugation을 통해 농축함. 농축된 virus particle의 농도를 P24 ELISA를 통해 측정함.
- 슈도바이러스를 이용한 감별진단기술 검증
    - 고병원성 및 저병원성 pseudotyped virus를 이용하여 감별진단키트의 성능을 검사함.
  - 감별진단기술 검증
    - 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 및 닭에서 감별진단을 요하는 NDV, IBV, AMPV를 포함한 시료를 이용한 민감도, 특이도를 검사.
    - 민감도와 특이도 평가를 위해서는 시판중인 간이검사키트 및 유전자검사법을 이용.

(2) 협동연구기관 (충남대학교 동물의학연구소)

- 감염시료 제작
  - 다양한 혈청형에 대한 진단기술의 성능을 검사하기 위해, 농림축산검역본부로부터 3종의 저병원성 조류인플루엔자바이러스를 분양받아 감염시료 제작에 사용함.
  - 유정란에서 배양한 조류인플루엔자바이러스를 닭에 비강투여한 뒤, 일주일동안 닭의 nasal swab, fecal swab, serum을 채취함. Swab sample의 경우 storage buffer에 부유시켜, 혈액은 혈청을 분리한 뒤 -20도에 보관함.
- 감염시료를 이용한 진단기술 검증
  - 원심분리를 통해 감염시료 내 오염물을 완전히 제거한 후, PBS에 단계희석한 감염시료를 이용하여 진단기술을 검증함. 96-well microplate에서의 진단기술로 측정된 결과를 ELISA, real-time PCR, virus titration을 통해 측정한 결과와 비교함.
- 동물시료 내 유효 오염물 탐색
  - 각 시료 내에 포함될 수 있는 오염물들에 대해 탐색하고 오염물의 종류 및 농도가 검사결과에 미치는 영향을 검사함으로써 감염시료 전처리 과정 중에 제거되어야 할 오염원을 선정함.



○ 감염시료 전처리 기술 개발

- 선정된 오염원을 제거할 수 있는 방법, 기술, 기구를 고안함.
- 감염시료의 경우 분변, 용혈, cell debris 등의 오염물을 포함할 수 있으며, 이러한 오염물은 검출기에서 발광신호를 받는 것을 방해할 가능성이 있으므로 이를 제거할 수 있는 시료 전처리 공정 및 기구를 개발하고자 함.
- 실험실상에서 원심분리를 통해 감염시료 내 오염물을 완전히 제거한 경우와 제거하지 않은 경우를 기준으로 오염물 제거 정도에 따른 결과를 분석함.
- 최적의 결과를 얻을 수 있는 오염물 제거 정도를 선정함.
- 오염물 제거를 위해서는 필터를 장착한 튜브형 기구를 제작할 예정임.

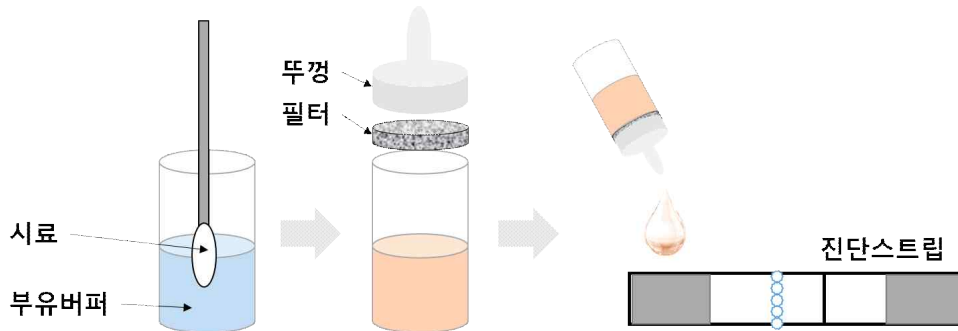


그림 10 감염시료 전처리 기기

○ 임상시료 확보 전략

- 기수행중인 연구를 위해 확보한 임상시료를 보유 중.
- 추가적으로 3곳 이상의 양계농가로부터 무작위로 10마리의 닭으로부터 nasal swab 및 fecal swab을 확보함.
- 추가적으로 3곳 이상의 충남지역 철새 서식지로부터 10종 이상의 분변 sample을 채집함.
- 전북대학교 조류질병연구센터 (센터장: 장형관 교수님)로부터 임상시료를 확보함.
- 농림축산검역본부와의 협력을 통해 임상시료를 확보함.

○ 시제품 성능 검사

- 최종적으로 제작된 시제품 (검출키트 및 검출기)의 성능을 평가함.
- 3종의 저병원성 인플루엔자바이러스와 1종의 고병원성 인플루엔자바이러스를 닭에 감염시켜 확보한 감염시료를 1차년도에 확립한 감염시료 전처리 기술을 이용하여 처리한 뒤, 검출키트에 도입하고 현장용 검출기를 이용하여 결과를 확인함.
- 다양한 경로로 확보한 임상시료를 시료 전처리 기술을 이용하여 처리한 뒤, 검출키트에 도입하고 현장용 검출기를 이용하여 결과를 확인함.
- 고병원성 인플루엔자바이러스의 검출을 위해서는 BSL3 실험실에서 수행할 예정임.

○ 정량화 프로그램 검증

- 연구 개발된 진단키트를 이용한 시료내 항원 정량

- 기존 시험법을 이용한 시료내 항원 정량
- 10종 이상의 혈청형 (혈청형 당 10개 시료)을 이용하여 성능평가를 수행하여 신뢰도를 측정.

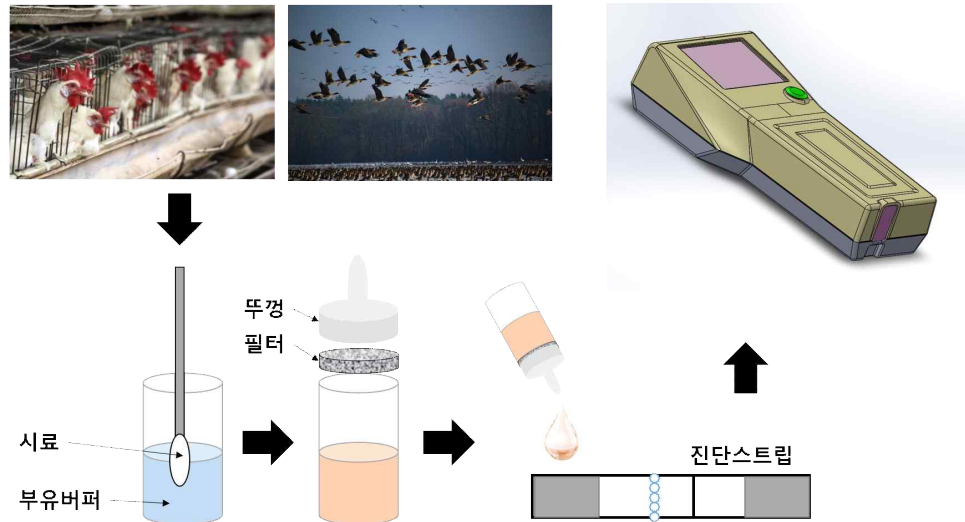


그림 11 시제품 성능 검사 순서도

(3) 협동연구기관 ((주)씨맥)

○ 광학 모듈 개발

- 휴대용 광학 분석기에 적용될 소형광학계 설계 및 검토
- 광검출부가 일체화된 광학 모듈 개발

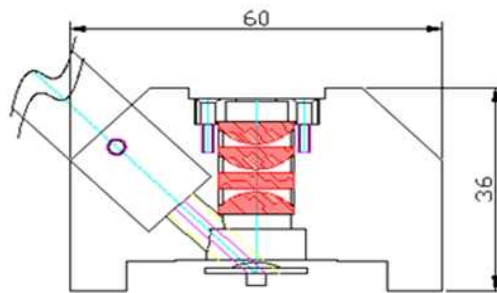


그림 12 소형광학계 예시도

○ 하드웨어 개발

- 휴대가 편리한 하드웨어 디자인 개발
- 키트 (스트립) 측정시 재현성 및 정확성이 확보되는 광검출부 및 이송부 설계

○ 펌웨어 / Touch panel LCD 개발

- 키트 (스트립) 측정을 위한 전자 보드 개발
- Touch panel LCD 작동 디자인 개발

- 시스템 동작 로직에 따른 신호처리(센서) 개발
- 근거리 무선통신으로 데이터 전송이 가능한 전자보드 개발

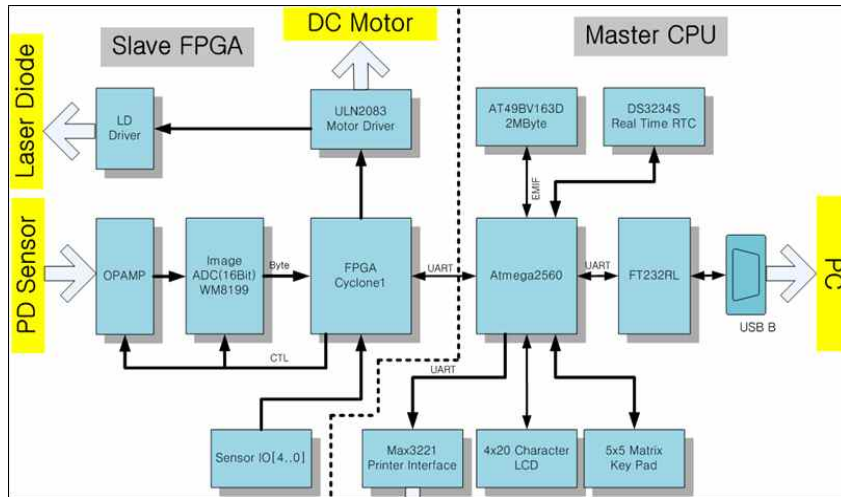


그림 13 동종 측정 시스템의 일반적인 PCB Block diagram

○ 성능평가

- 스트립 형광 출력신호 평가
- 시스템 성능 안정도, 정밀도, 정확도 등 세부 개발 목표에 대한 평가

○ 시제품 제작

- Rapid kit 표준샘플 제작

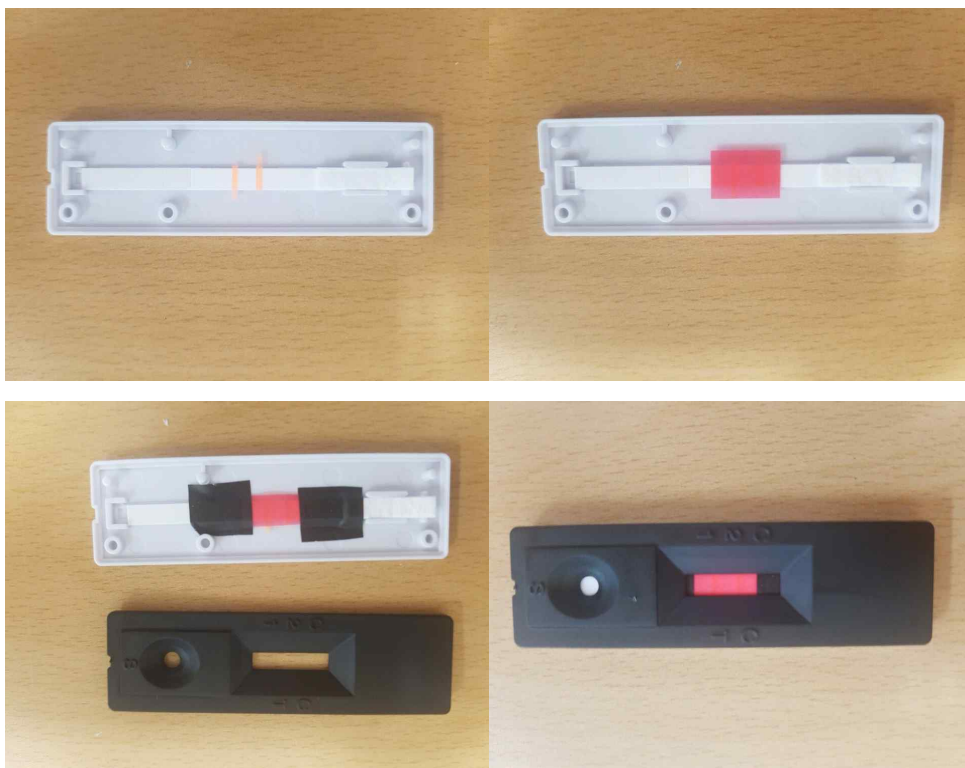


그림 14 신속진단 키트 표준샘플 제작 예

- 집광 cylinder lens 제작



그림 15 집광 cylinder lens 제작 예

- 측정 하드웨어 기구물 제작

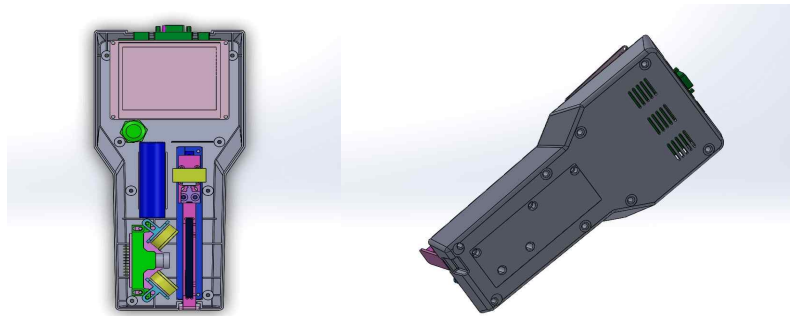


그림 16 측정 하드웨어 기구물 제작 예

○ 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작

○ 경제성 평가 및 판로확보

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 주관연구기관 (충남대학교 수의과대학)

(1) 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발 및 최적화

- High pathogen influenza virus와 low pathogen influenza virus를 감별할 수 있는지 알아보기 위해 단백질해 효소와 pH차이를 주고 cell과 cell의 fusion을 GFP발현을 통해 확인하였다.
- High pathogen influenza virus는 감염을 매개하는 HA protein이 이미 절단된 형태로 발현되며 세포에 감염하기 위해 세포 내 단백질해효소의 작용을 필요로 하지 않는다.
- 다양한 assay (cell-cell fusion assay, FFWO assay, intervirion assay)를 통해 진단기술을 검증하고 최적화하기 위한 연구를 수행하였다. DSP1-7 과 DSP8-11을 각각 발현하는 세포 및 pseudovirus particle을 high pathogen influenza virus와 low pathogen influenza virus를 다양한 조성(비율)에 반응시켰다. 반응물에 pH5.0의 buffer를 가하여 바이러스 사이의 fusion을 일으켰다. Renilla luciferase assay를 통해 fusion의 정도를 확인하였다.
- 결과
  - Cell-cell fusion assay를 이용한 진단기술 검증

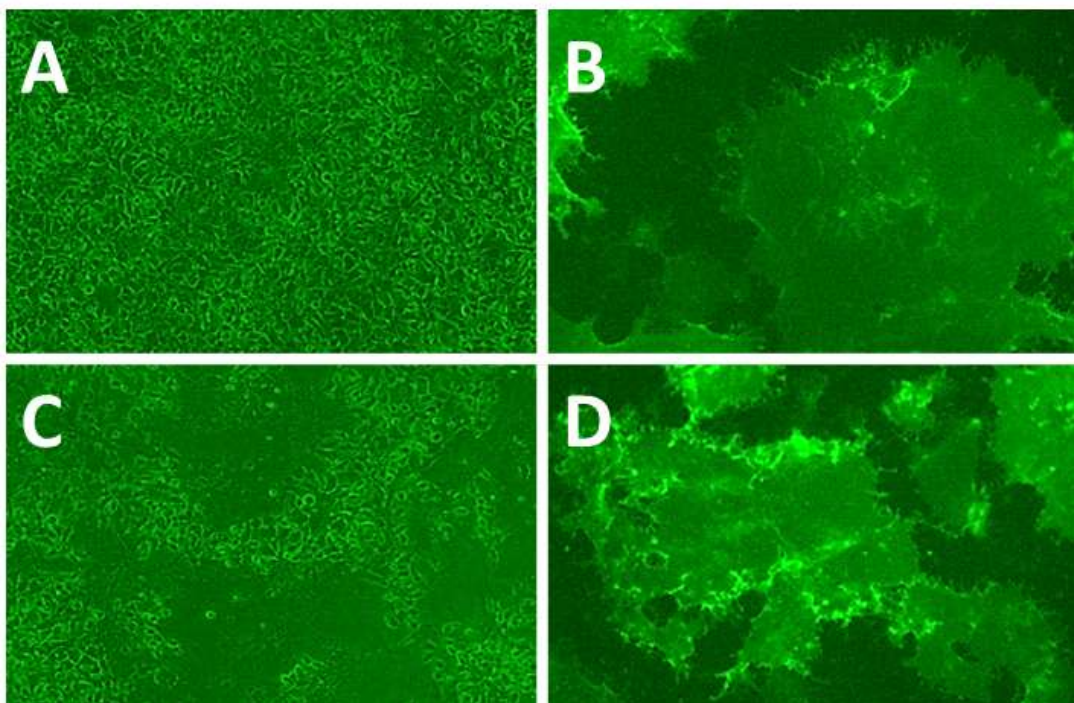


그림 17 Cell-cell fusion assay

A: No HA, B: HP HA, C: LP HA, D: LP HA with trypsin

- FFWO assay를 이용한 진단기술 검증

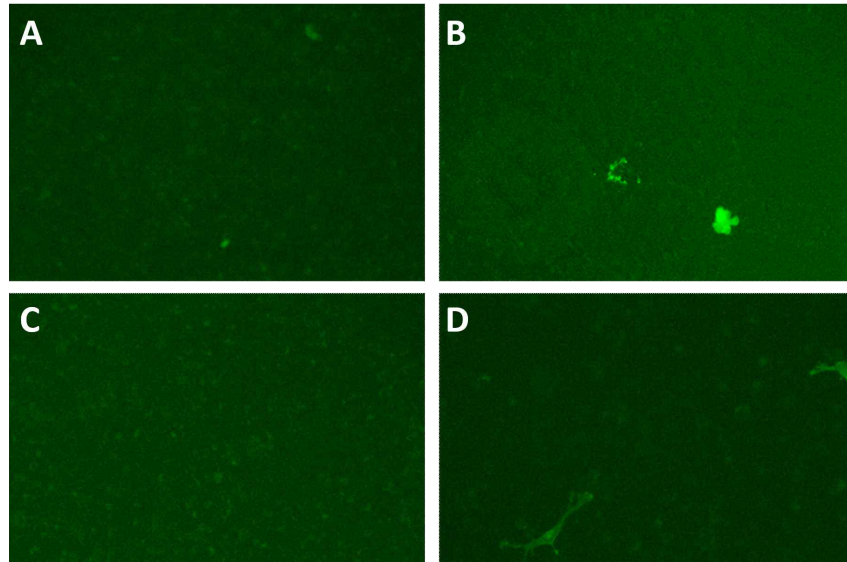


그림 18 FFWO assay

A: Bald pp, B: HPAI pp, C: LPAI pp, D LPAI pp with trypsin

- Intervirion assay를 이용한 진단기술 검증

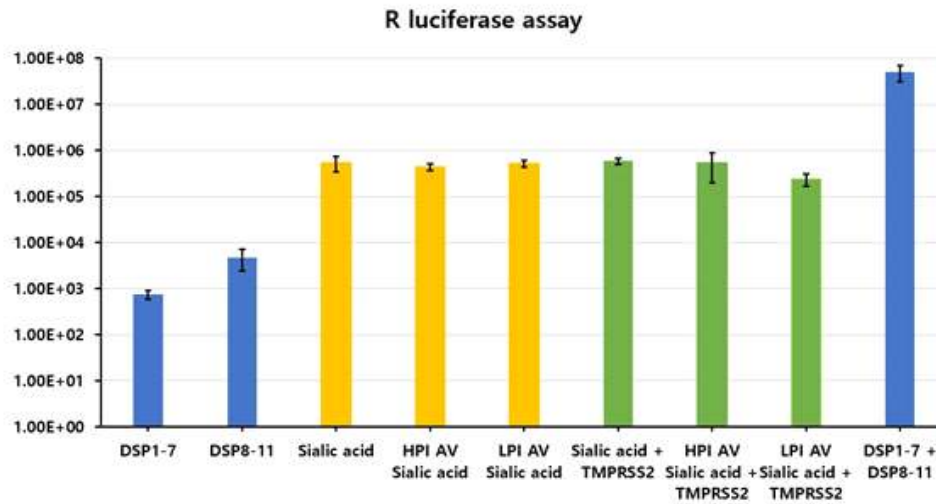


그림 19 Virus-virus fusion (intervirion) assay

- 진단 키트의 검출기 테스트를 위해 positive control인 HIV pseudovirus particle을 제작해야 한다.
- Dual split protein(DSP)은 Renilla luciferase(RL)과 GFP로 이루어져 있으며, self reassociation시 RL과 GFP모두 활성화된다.
- HEK-293T cell에 S15 DSP1-7과 S15 DSP-8-11를 encoding하는 plasmid와 HIV core protein을 encoding하는 plasmid를 co-transfection 시키고, 48~ 72h 후 고농도의 particle을 위해 10,000xg 4℃ 18h 조건에서 ultracentrifugation하였다. HIV pseudovirus particle 발현을 확인하기 위해 R luciferase assay를 진행하였다.

## Generation of HIV pseudovirus particle including DSP1-7 and DSP8-11

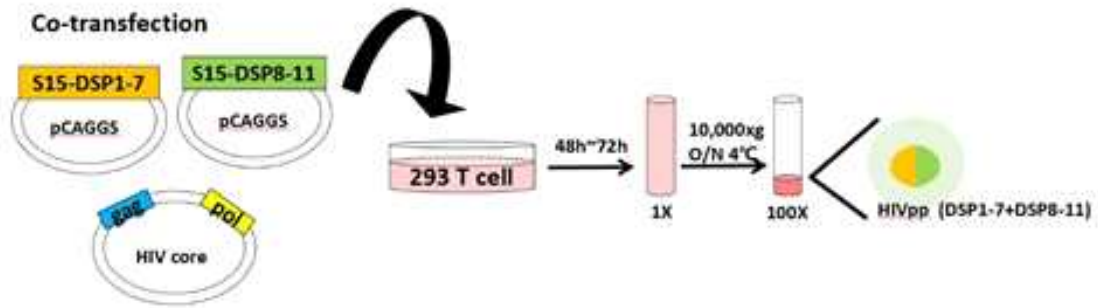


그림 20 Nanoparticle 제작방법

- HEK 293T cell에 DSPs plasmid와 HIV core plasmid를 co-transfection 시킨 후 48시간 후에 nanoparticle을 얻었다. Particle을 renilla luciferase substrate와 1:1 ratio로 반응시킨 후, luciferase activity를 통해 particle을 확인하고 (그림20), DSPs의 GFP 관찰로 particle의 생성을 확인하였다 (그림21).

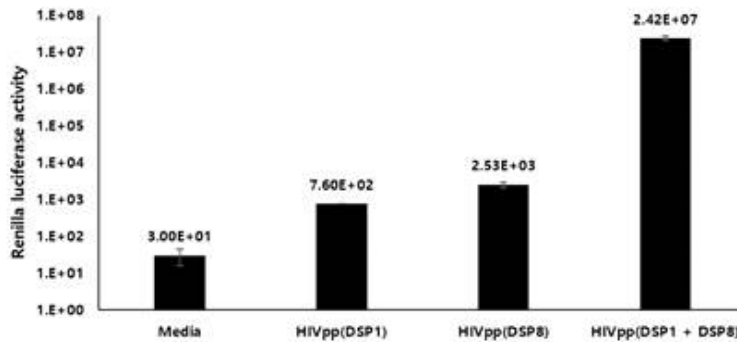


그림 21 Nanoparticle 에서의 renilla luciferase 검출

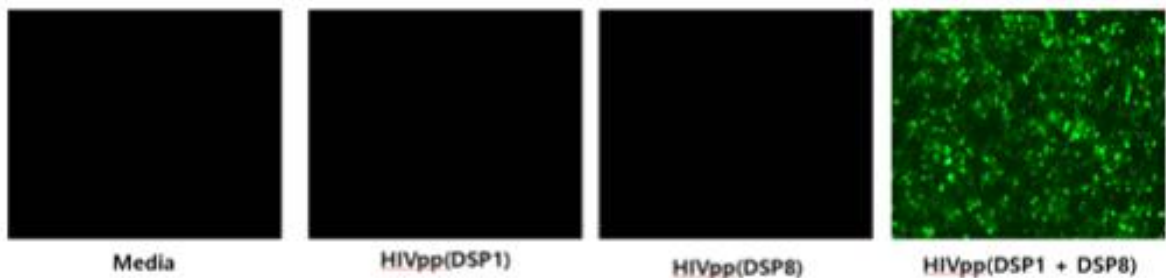


그림 22 Nanoparticle에서의 GFP 발현 검출

- (2) 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 반응조건 최적화

- 온도 (4°C, 37°C, RT)와 시간 (10min, 30min, 1h)이 receptor와 DSPs를 bearing 하고있는 nanoparticle과 virus의 binding에 어떻게 영향이 미치는지 알아보기 위해, 고병원성 슈도바이러스 HIVpp(HPAI)를 이용하여 각각의 조건에서 binding 시킨 후 activity를 확인하였다.

- 그 결과 activity 값이 온도는 각각 큰 차이는 없었지만 4°C에서 조금 더 높았고, 시간은 10min보다는 30min과 1h에서 더 반응이 높았지만 그 중 1h가 조금 더 높았다. 그래서 nanoparticle과 virus의 binding의 최적화 조건은 4°C에서 1h으로 정하였다.

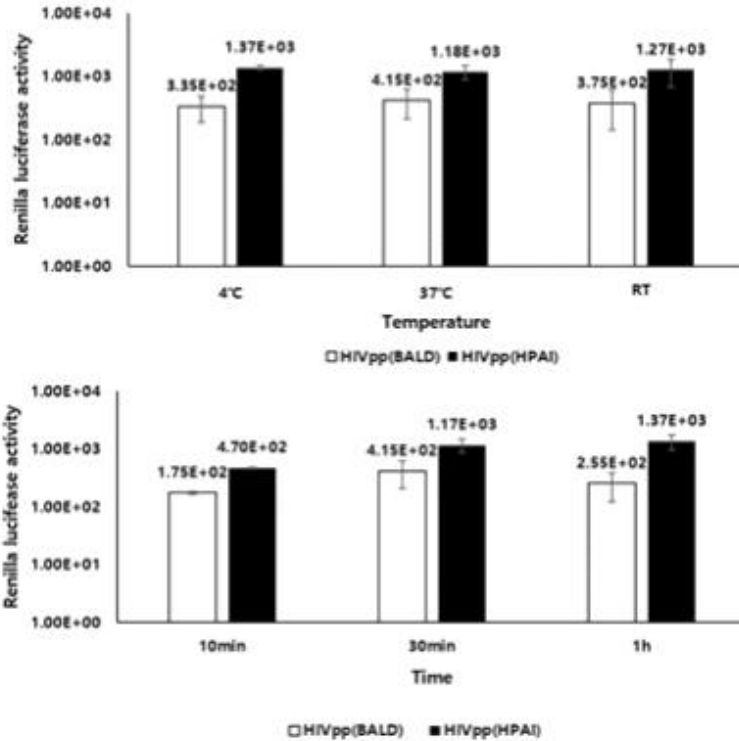


그림 23 온도 및 시간 최적화

- Receptor와 DSPs를 bearing하고있는 nanoparticle과 virus의 ratio에 따라 activity가 달라지는지 보기위해, nanoparticle과 고병원성 슈도바이러스를 1:1, 1:3 ratio로 각각 4°C에서 1시간 동안 binding시킨 후, particle과 pH 4.6 buffer를 5:1 ratio로 fusion을 일으켰다. 그 다음 Renilla luciferase substrate와 1:1 ratio로 반응시킨 후, activity 값을 측정하였다.
- 그 결과, nanoparticle과 슈도바이러스의 ratio가 1:3 일 때, activity가 높았다.

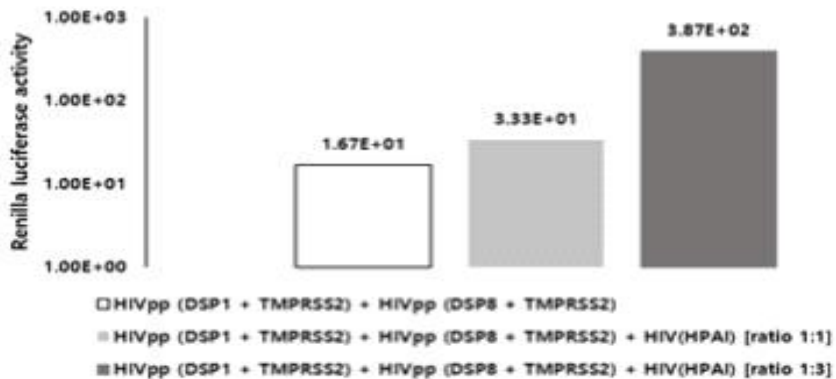


그림 24 Nanoparticle과 인플루엔자바이러스 혼합비율 최적화



- DSP1 bearing nanoparticle과 DSP8 bearing nanoparticle의 ratio에 따라 binding activity가 달라지는지 보기위해, ratio를 1:1, 1:5, 5:1로 하여 particle과 고병원성 슈도바이러스를 4°C에서 1시간 동안 binding시킨 후, particle과 pH 4.6 buffer를 5:1 ratio로 fusion을 일으켰다. 그 다음 Renilla luciferase substrate와 1:1 ratio로 반응시킨 후, activity 값을 측정하였다.
- 그 결과, DSP1-7 bearing particle과 DSP8-11 bearing particle의 ratio 차이에 큰 변화가 없었으므로 1:1 ratio로 정하였다.

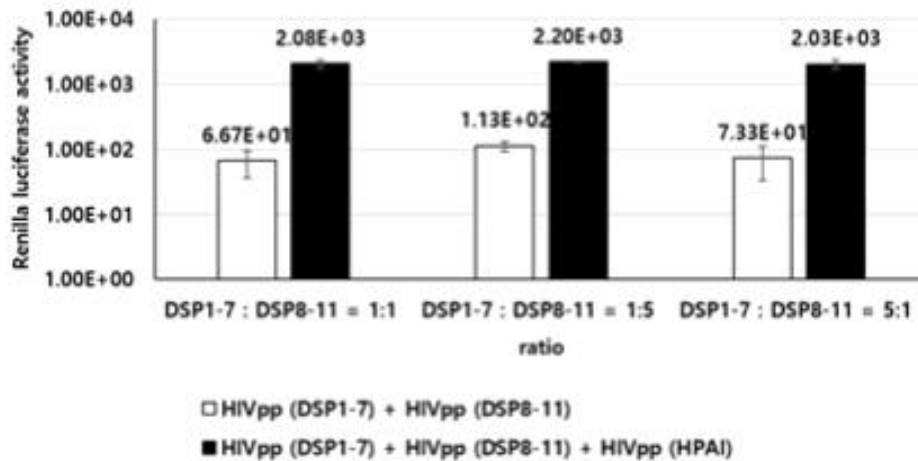


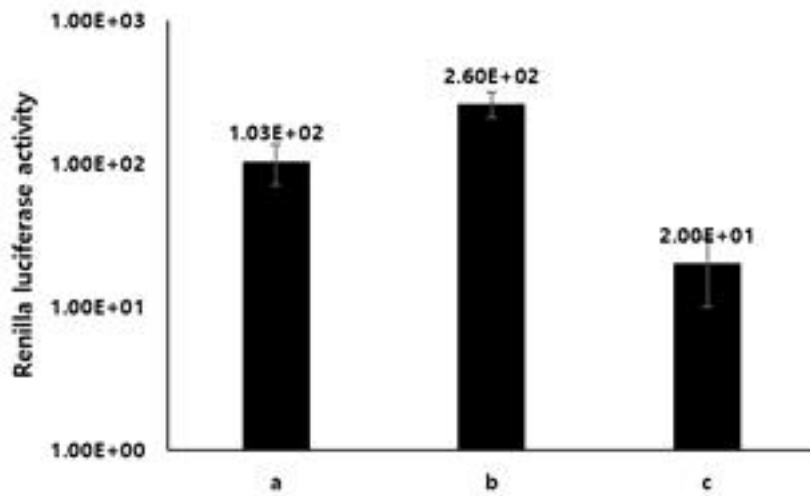
그림 25 Nanoparticle 혼합 비율 최적화

- pH가 5.0일 때 바이러스의 fusion반응이 일어나기 때문에 pH 7.0인 virus가 pH 4.6 buffer와 어떤 ratio에서 pH가 5.0이 되는지 보기위해 여러 가지 ratio로 PBS와 반응시켰다.

	PBS (pH 7.0) : pH 4.6 buffer	pH
Ratio	1 : 10	4.6
Ratio	1 : 5	4.6
Ratio	1 : 1	4.6
Ratio	10 : 1	5.4
Ratio	5 : 1	5.0

그림 26 pH buffer 조성

- 그 결과, particle과 pH 4.6 buffer가 5:1 ratio의 반응에서 pH가 5.0이 되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 같은 조건으로 receptor, DSPs, 단백질해효소인 TMPRSS2를 bearing하는 nanoparticle과 저 병원성 바이러스인 H9N2 virus의 반응에서도 virus가 더 많을 때, activity가 높았다.



HIVpp (DSP1 + TMRSS2) 100ul + HIVpp (DSP8 + TMRSS2) 100ul + H9N2 virus 600ul
a : particle 100ul + pH bfr 100ul => particle : pH bfr = 1 : 1
b : particle 100ul + pH bfr 20ul => particle : pH bfr = 5 : 1
c : particle 20ul + pH bfr 100ul => particle : pH bfr = 1 : 5

그림 27 pH buffer 조건 최적화

- pH 4.6 buffer를 이용한 fusion 반응이 온도(37°C, RT)에 따라 activity값이 변화가 있는지 보기위해, 저병원성 슈도바이러스와 고병원성 슈도바이러스를 nanoparticle 과 4°C에서 1시간동안 binding 시킨후, 37°C, RT에서 각각 30min동안 fusion 시키고 renilla luciferase substrate와 1:1 반응시켜 activity값을 확인하였다.
- 그 결과, fusion반응의 온도는 37°C와 RT에서 큰 차이가 없었으므로 RT에서 fusion을 일으키기로 정하였다.

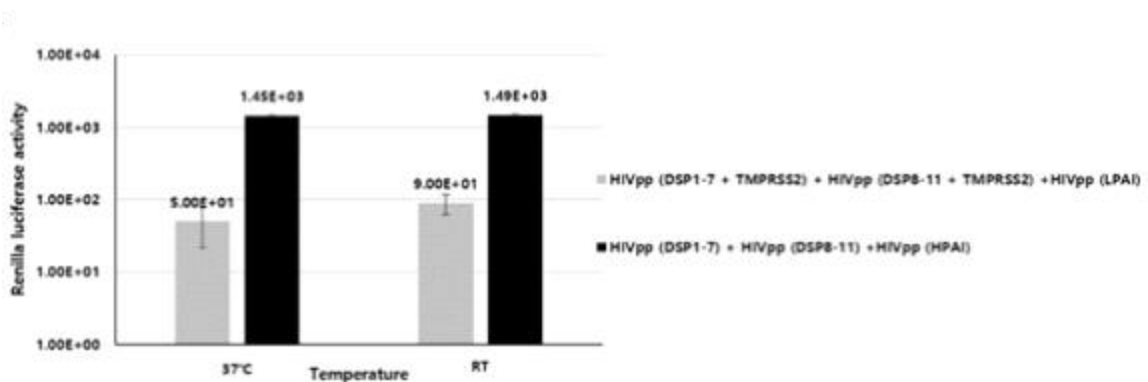


그림 28 Fusion을 위한 온도, 시간 조건 최적화

### (3) 현장용 검출키트 제작

- 진단 스트립 키트 제작을 위해 pseudovirus particle을 지지할 수 있는 membrane에서 dot blot assay를 진행하였다.
- HIV pseudovirus particle을 10 fold dilution시킨 뒤, PVDF membrane을 이용해 dot blot assay를 진행하였다. Membrane을 다시 renilla substrate와 반응시킨 후, R luciferase assay를 통해 membrane에서의 pseudovirus particle의 발현을 확인하였다.

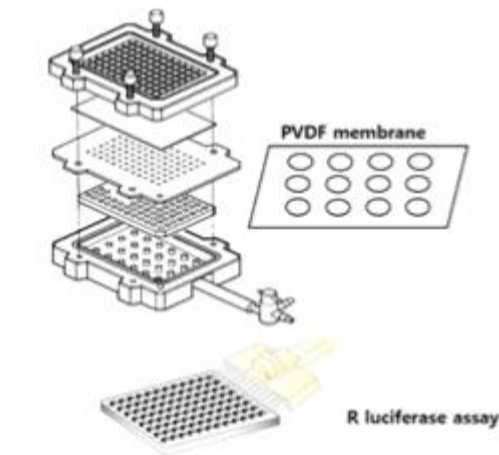


그림 29 Dot Blot 방법

- PVDF membrane에 blotting한 DSP nanoparticle을 이용해 R luciferase assay를 수행한 결과 renilla luciferase activity가 검출되었으며, 농도에 따라 달라지는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 29).

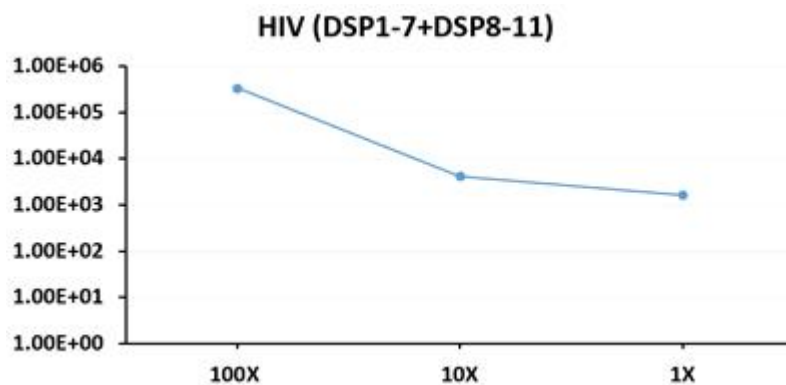
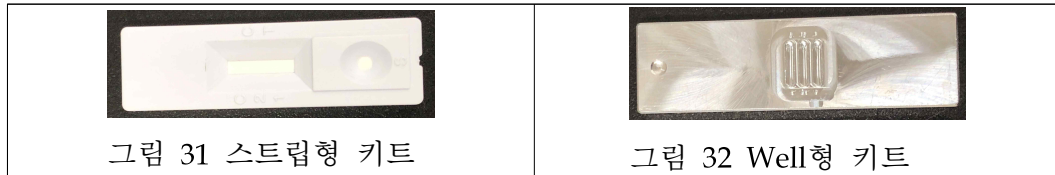


그림 30 Dot blot 후 실시한 renilla luciferase assay 결과

- Dot blot 으로 PVDF membrane에 blotting한 DSP nanoparticle을 인플루엔자바이러스와 반응시킨 뒤 renilla luciferase activity를 측정 한 결과, 반응이 검출되지 않았다.

- 반복실험 결과 membrane을 이용한 진단키트 개발에 어려움이 있을 것으로 생각되어 well-type의 검출키트를 제작하고, 협동연구기관인 (주)씨맥과의 논의를 거쳐 이를 측정하기 위한 현장용 검출기를 개발하였다.



(4) 현장용 검출기의 측정 감도 및 한계 검사

- 현재 인플루엔자 진단을 위해 상용화 되어있는 VDRG 조류인플루엔자 바이러스 항원 간이진단키트에서 저병원성 인플루엔자 바이러스인 H9N2 virus를 10 fold로 serial dilution시켰을 때 얼마나 측정이 가능한지 시험하였다.

**VDRG 조류인플루엔자 바이러스 항원 간이진단키트 2.0**

- Influenza A virus  
(A/chicken/Korea/MS96/96(H9N2))  
⇒ 10<sup>5.5</sup>/0.2ml EID<sub>50</sub>
- 10 fold serial dilution
- Measure : 100ul

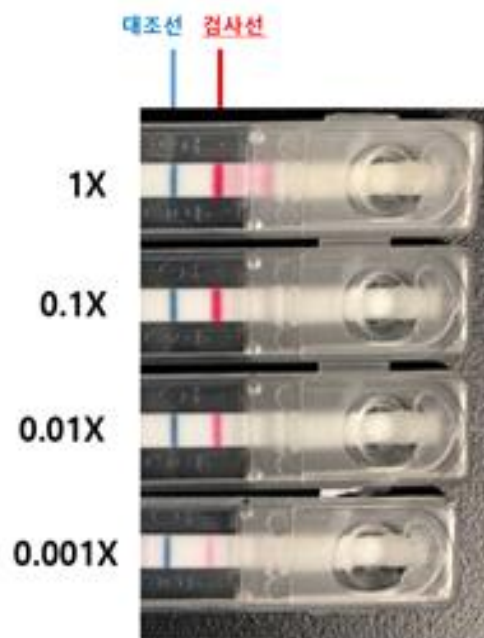
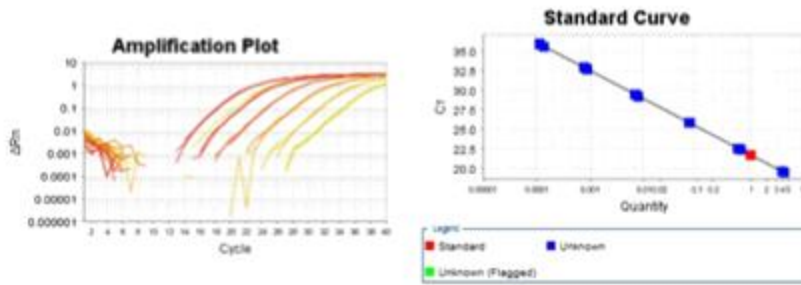


그림 33 H9N2 간이 검출 키트 측정 시험

- 인플루엔자 바이러스 진단에 쓰이는 Power Check Avian Influenza H9N2 Real-time PCR kit에서 저병원성 인플루엔자 바이러스인 H9N2 virus를 10 fold로 serial dilution시켰을 때 얼마나 측정이 가능한지 시험하였다.

**PowerCheck Avian Influenza H9N2 Real-time PCR kit**

- Influenza A virus  
(A/chicken/Korea/MS96/96(H9N2))  
⇒ 10<sup>5.5</sup>/0.2ml EID50  
- 10 fold serial dilution



Sample	Ct
H9N2 virus 1 X	19.54
H9N2 virus 1/10 X	22.52
H9N2 virus 1/100 X	25.86
H9N2 virus 1/1,000 X	29.42
H9N2 virus 1/10,000 X	32.81
H9N2 virus 1/100,000 X	35.83

그림 34 H9N2 PCR 키트 측정 시험

- 동일한 시료를 연구개발 중인 검출키트로 측정하고 측정 감도 및 한계를 기준에 이용 중인 2종의 진단키트와 비교 분석하였다.

(5) 고병원성 인플루엔자 감별진단용 test kit 제작

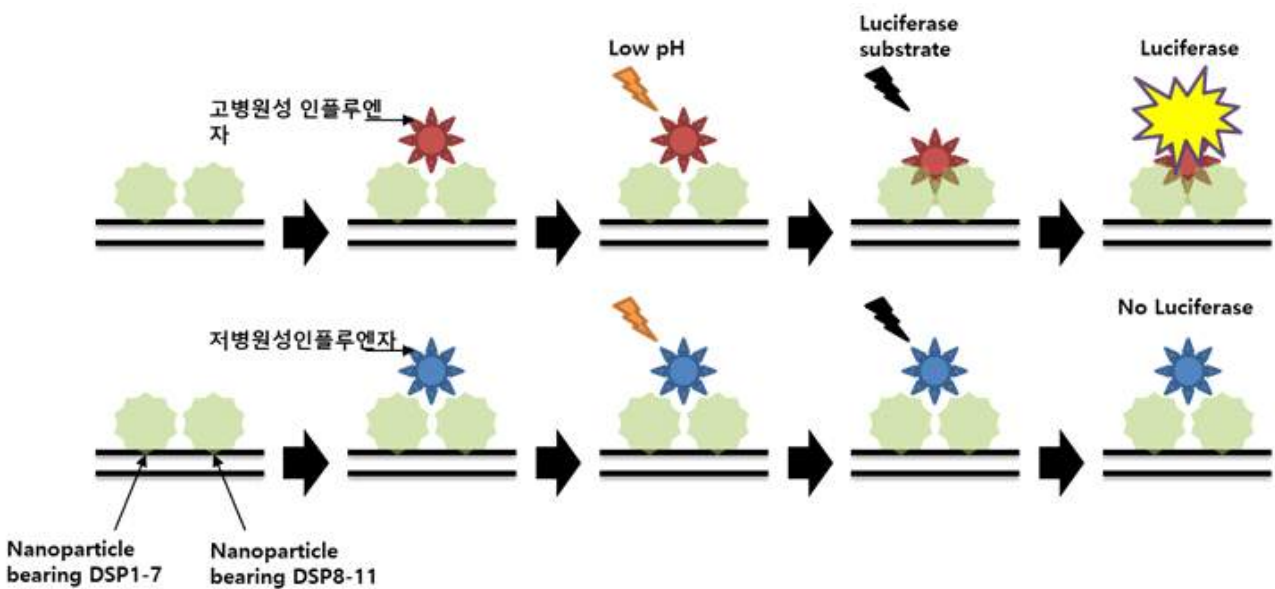


그림 35 고병원성 저병원성 인플루엔자 감별진단용 진단법 모식도

- 고병원성과 저병원성 인플루엔자 감별진단용 test kit 제작을 위해 2종류의 DSP nanoparticle을 제작하였다.

- 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 진단용 DSP nanoparticle은 DSP와 sialic acid를 발현하도록 제작하고, 저병원성 인플루엔자 진단용 DSP nanoparticle은 DSP, sialic acid, Tmprss2를 발현하도록 제작하였다.

(6) 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작

- HEK 293T cell에 HIV core plasmid와 empty vector, low pathogenic hemagglutinin, high pathogenic hemagglutinin, neuraminidase를 각각 co-transfection 시킨 후, 48시간 후에 상층액인 슈도바이러스를 얻었다.
- 슈도바이러스를 Huh cell에 transduction 시킨 후, 48시간 후에 cell을 lysis 시키고 firefly luciferase substrate와 1:1 ratio로 반응시켜, activity를 나타냈다.

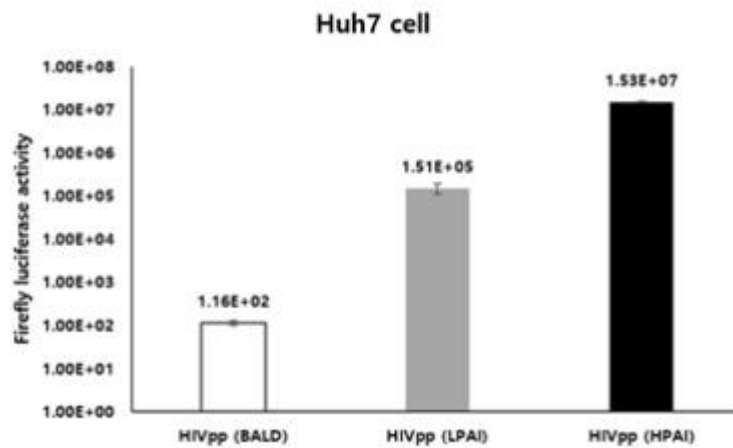


그림 36 인플루엔자 슈도바이러스 제작

(7) 슈도바이러스를 이용한 감별진단기술 검증

- 고병원성 인플루엔자 바이러스를 감별하기 위해 고병원성 슈도바이러스와 저병원성 슈도바이러스를 DSPs nanoparticle과의 반응을 나타냈다.
- DSPs particle과 trypsin이 처리된 저 병원성 슈도바이러스, 고병원성 슈도바이러스, 단백분해효소인 Tmprss2를 bearing하는 DSPs nanoparticle과 저병원성 슈도바이러스를 각각 4℃에서 1시간 동안 binding시킨 후, particle과 pH 4.6 buffer를 5:1 ratio로 fusion을 일으켰다. 그 다음 Renilla luciferase substrate와 1:1 ratio로 반응시킨 후, activity 값을 측정하였다.
- 그 결과 저 병원성 슈도바이러스는 단백분해효소가 존재할 때 activity가 나타났으며, 고병원성 슈도바이러스는 단백분해효소의 유무와 관계없이 activity가 나타났다.

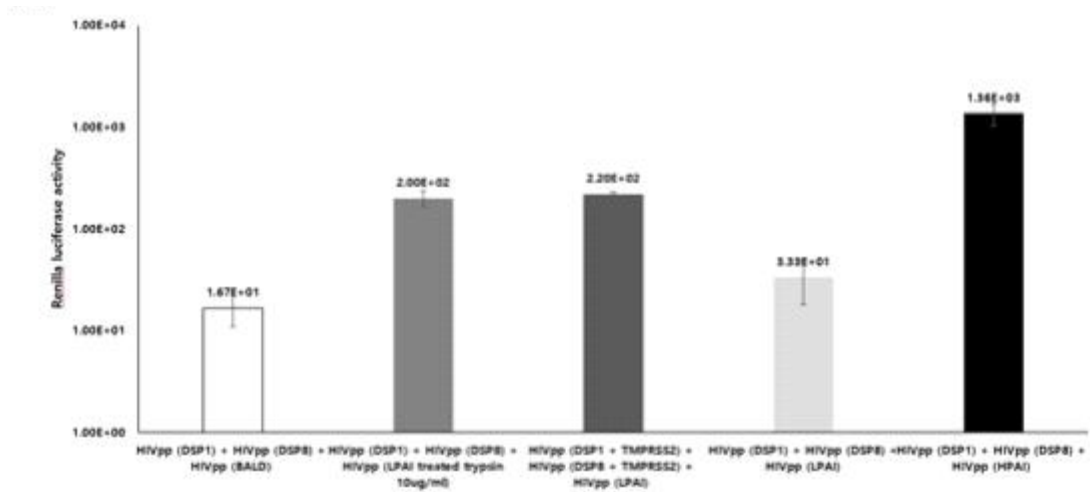


그림 37 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 검출 실험 (1차)

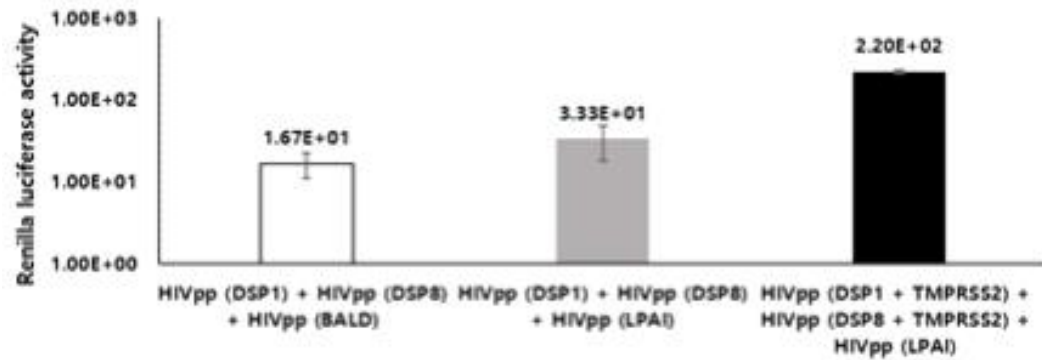


그림 38 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 검출 실험 (2차)

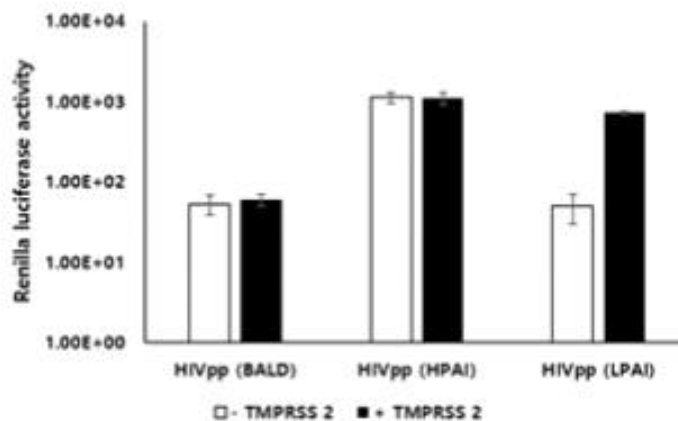


그림 39 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 검출 실험 (3차)

(8) 기타 조류바이러스와의 감별진단기술 검증

- 감별진단기술의 검증을 위해, 다양한 strain의 조류인플루엔자 바이러스 및 조류에 감염을 일으키는 바이러스를 이용하여 감별진단기술을 검증한 결과, 인플루엔자 바

이러스에서만 특이적인 반응이 나타나는 것을 확인하였다.

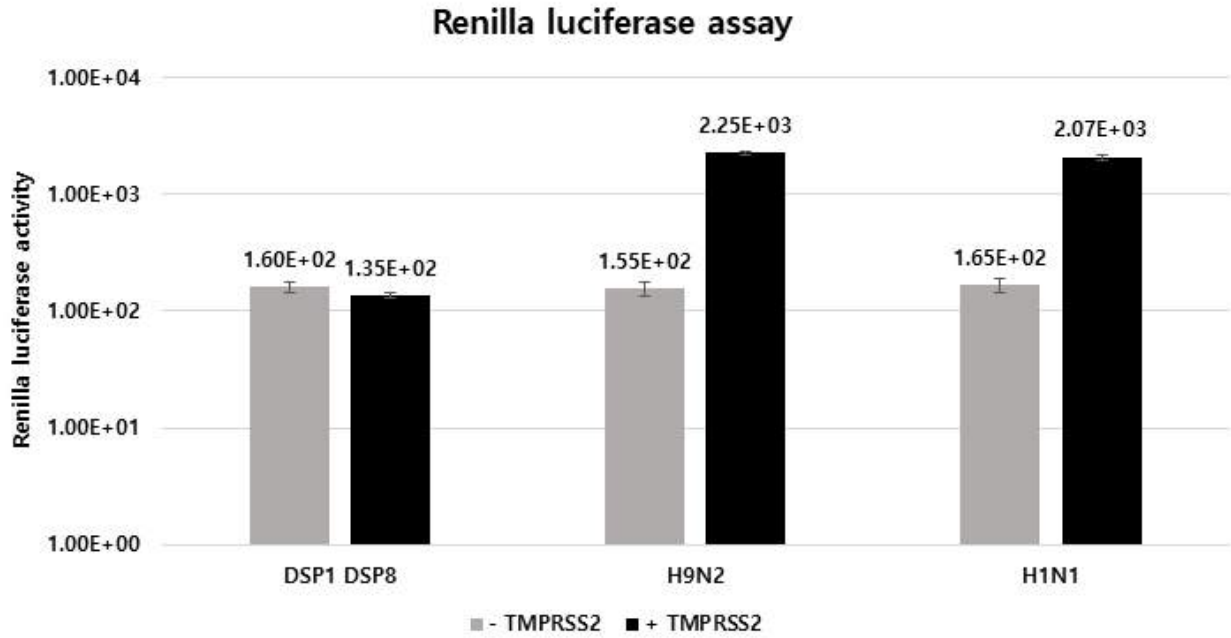


그림 40 Authentic 바이러스를 이용한 감별진단기술 검증

○ 2세부기관으로부터 확보한 임상시료(철새분변)를 이용하여 감별진단기술을 검증함.

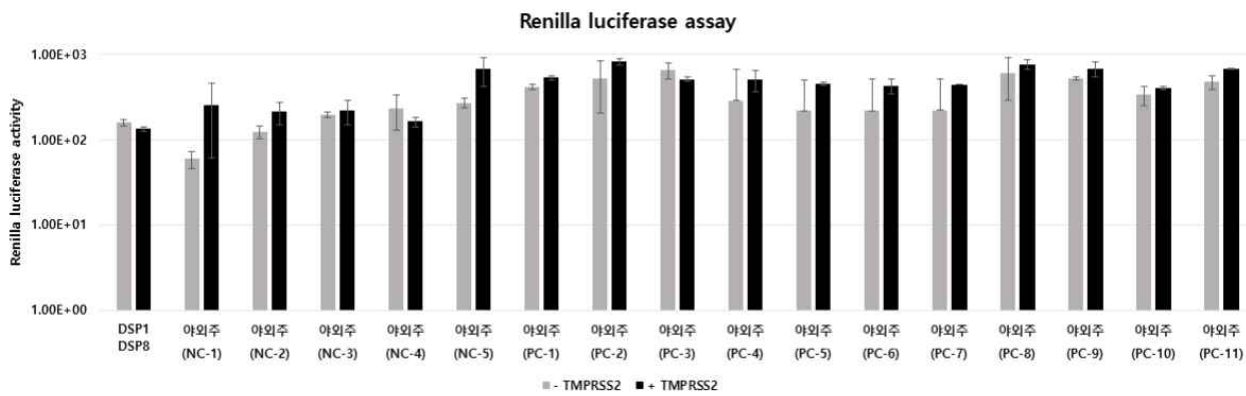


그림 41 임상시료를 이용한 진단기술 검증



## 2-2. 세부연구기관 (충남대학교 동물의과학연구소)

### (1) 감염시료 제작

#### ○ 바이러스 분양 및 배양

- 농림축산검역본부 및 국가병원체자원은행에서 총 2종의 저병원성 조류인플루엔자 바이러스를 확보하였음.

Strain	출처 (Reference)
H9N2	농림축산검역본부 (수의유전자번호: VR1100013)
H1N1	국가병원체자원은행 (NCCP No. 43001)

<표> 농림축산검역본부 및 국가병원체자원은행에서 확보한 인플루엔자 바이러스 종류

- 확보한 두 종의 바이러스를 유정란을 이용하여 배양하여 총 20 ml 이상의 바이러스를 각각 확보한 후 바이러스 보존액 (25% glycerol in PBS)을 혼합하여 -80℃에 보관하였음.



그림 42 유정란을 이용한 인플루엔자 바이러스 배양

- 유정란에서 배양한 바이러스는 요막강액에 의한 혼탁이 심하여 바이러스가 없는 요막강액으로도 세포독성이 나타나는 등 인플루엔자바이러스를 사용하는데 어려움이 있어 세포를 이용한 바이러스배양을 수행하였음.

#### 요막강액에 의한 세포독성

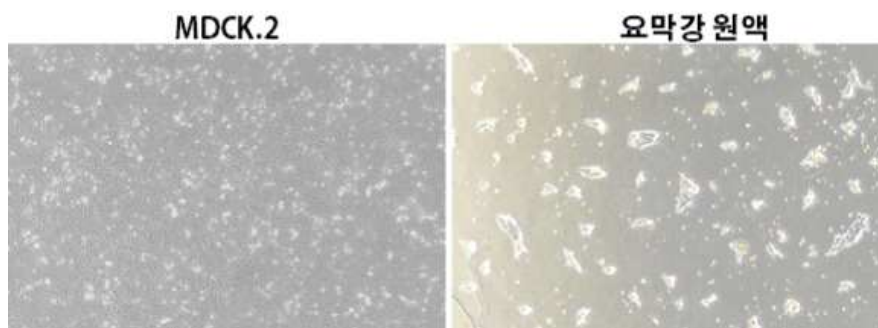


그림 43 요막강 원액의 세포 독성

- 인플루엔자 바이러스에 감수성이 있어 배양에 주로 사용되는 MDCK.2 (ATCC, CRL-2936)를 이용하여 요막강액에서 얻은 H9N2 바이러스를 1/100으로 EMEM 배지에 희석하여 배양하였고 바이러스에 의한 cytopathic effect를 확인하였음.



그림 44 세포를 기반으로 한 인플루엔자 바이러스의 배양

○ 바이러스 배양 확인

- 인플루엔자 바이러스의 유무를 확인하기 위하여 구조단백질 M1 유전자에 대한 프라이머를 준비하고 배양액에서 RT-PCR을 통해 확인하였음.

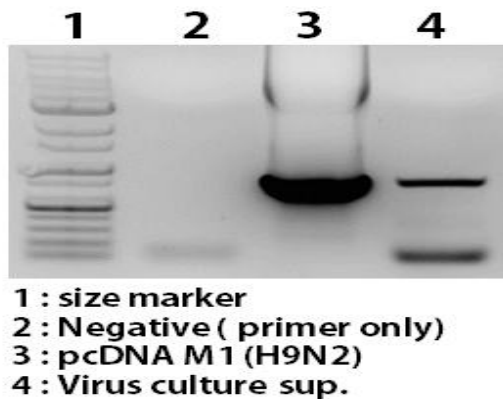


그림 45 RT-PCR을 이용한 세포배양액으로부터의 바이러스 유무 확인

○ 바이러스 감염시료 제작

- 확보한 바이러스를 각각 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub> titier로 3주령된 육계 1마리씩 비강으로 1회 투여하였으며 투여 하루 전 1회 투여후 2회 (day3, day5)걸쳐 nasal swab sample 과 fecal sample을 얻어 -80℃에 보관하였음.
- 원심분리를 통해 감염시료 (fecal sample) 내 오염물을 제거한 후 PBS에 1:10으로 희석하였다. 희석한 감염시료에서 viral genome extraction kit (GeneAll)를 이용하여 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 통해 바이러스의 유무를 확인하였음.

(2) 감염시료를 이용한 진단기술 검증

- H9N2를 이용해 제작한 감염시료를 이용하여 주관연구기관인 충남대학교 수의과대학에서 개발한 진단키트의 유효성을 평가하였다.

○ 그 결과, H9N2를 접종한 닭에서 채취한 분변샘플에서 양성반응이 검출되었다.

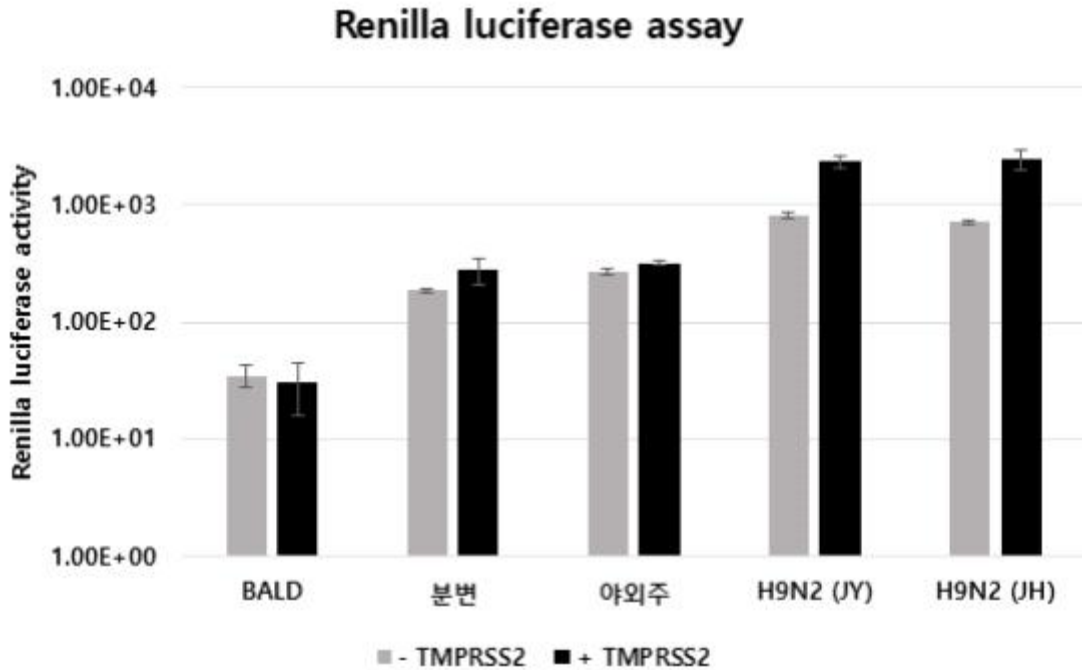


그림 46 감염시료를 이용한 진단기술 검증

(3) 동물시료 내 유효 오염물 탐색

- Nasal swab sample의 경우 원심분리를 통해서도 점액질 덩어리들이 완전히 가라앉지 않는 경우가 많았음.
- Fecal sample의 경우 원심분리 후에도 샘플의 탁도가 심하였음.
- 두 가지의 sample 모두 filtration을 이용한 샘플의 전처리가 필수적이었고 filtration 후에 샘플에 있는 바이러스의 손실을 줄이는 방법에 대한 실험을 수행하였음. (2차년도 결과)

(4) 감염시료 전처리 기술 개발

- 시료 전처리 기구 개발
  - 우선 유효 오염물의 경우 PBS에 회석을 해도 남아있는 부유물 덩어리들이 장애였으며 1차적으로 이것들을 제거하기 위해 90 mm pore size의 filter paper를 이용하였음.
  - 이후 탁도를 형성하는 미세 부유물들을 제거하기 위해 0.45  $\mu$ m pore size의 PVDF membrane을 이용하였음.
  - 간단히 25 ml 정도 용량의 플라스틱 bottle과 squeeze bottle의 마개를 이용하여 다음과 같은 기구를 제작하였음.
  - 마개의 완전한 sealing을 위하여 parafilm을 이용하였고 filter 부분을 노출하기

위하여 도너츠 모양으로 제작하였다. 그리고 filter paper (아래), PVDF membrane (위) 차례대로 위치시킨 후 parafilm으로 덮어 filter cassette를 제작하였음.

- 준비된 감염시료를 10 ml의 PBS가 담긴 bottle 안에 넣고 준비된 filter cassette를 bottle에 얹는다. 마개를 덮고 bottle을 잘 흔들어 감염시료를 부유시킴.
- Bottle을 squeeze 하여 double filter에 걸러진 샘플을 짜냄.
- 감염시료를 이용하고 filtering을 하였을 때 바이러스가 검출되는지 또한 바이러스가 어느정도 손실되는지를 RT-PCR, ELISA 등을 통하여 검증하였음. (2차년도)

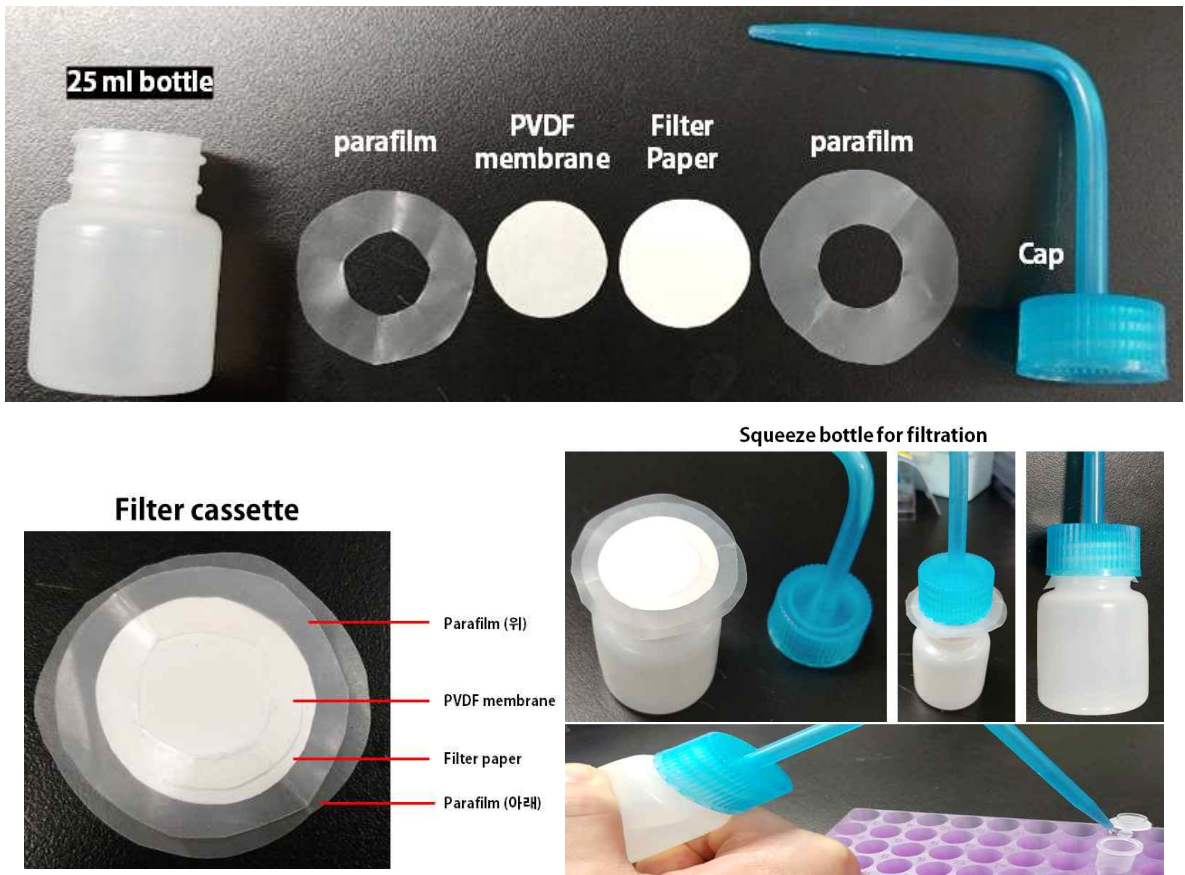


그림 47 PVDF membrane을 이용한 분변 샘플 전처리 기구 개발

#### (5) 임상시료 제작

##### ○ 조류 분변 샘플 채집

- 조류인플루엔자 바이러스의 임상시료를 확보하기 위하여 다음의 철새 도래지에서 직접 분변 샘플을 수집하였음.
- 3군데의 철새 도래지에서 총 1000개 정도의 분변샘플을 채취하였음
- 조류인플루엔자 바이러스의 확인 및 분리를 위하여 분변을 PBS에 희석하고 원심분리를 통하여 상층액만 -80 °C에 보관하였음.



충남 서산시 부석면 천수만로 655-73



경상남도 창녕군 유어면 대대리



충청남도 서천군 화양면 장산로

그림 48 분변샘플을 채취한 장소의 위치 및 전경 (순서대로 <서산버드랜드> <창녕 우포늪> <군산 금강하구>)

○ 분변 샘플에서의 바이러스 검출

- 수집한 분변 분변샘플에 인플루엔자 바이러스의 유무를 확인하기 위해 인플루엔자 바이러스 Matrix priten1 (M1) 유전자의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였음.
- PBS에 희석한 분변샘플에서 바이러스 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 다음의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였음

<Primer sequence>

- AI M Sense: ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAAC
- AI M Anti-sense: CTTGAATCGTTGCATTTGCACTCC

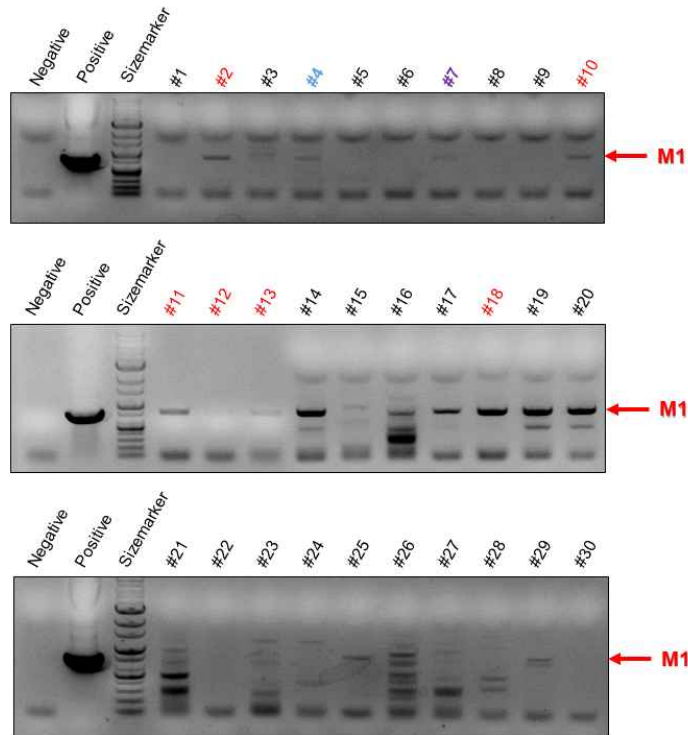


그림 49 서산, 창녕, 군산에서 수집한 분변새물에서 바이러스 유무를 확인하기 위한 PCR

- 1000여개의 분변 샘플 중에서 약 15개의 조류인플루엔자 바이러스 양성 샘플을 확인하였으며 이 중 6개 정도의 샘플을 sequencing analysis를 수행한 결과 모두 조류인플루엔자 M1 유전자를 가지고 있는 양성 샘플로 최종 확정하였음.

○ 검출된 바이러스의 유전자 염기서열 확인

- M1 유전자를 분석해본 결과 모두 H9N2 (저병원성 조류독감 바이러스) 와 거의 동일한 M1 염기서열을 가지고 있는 것으로 확인함.



## Avian Influenza Indirect ELISA

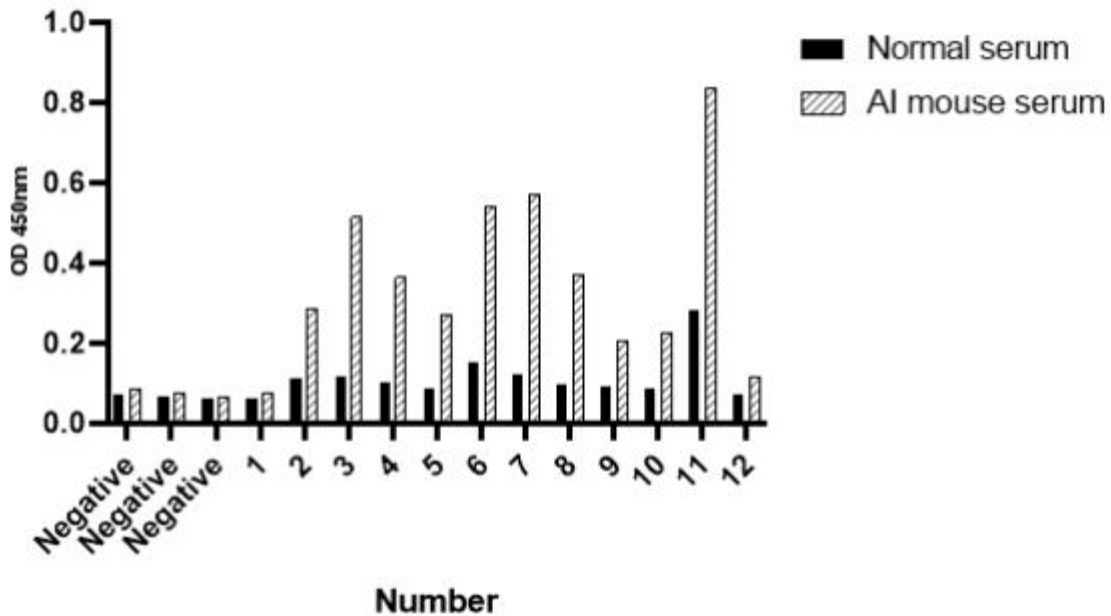


그림 52 분변샘플에서 바이러스 유무를 확인하기 위해 수행한 조류독감 단클론 항체를 이용한 ELISA

- 조류독감바이러스에 대한 ELISA 수행 결과 PCR 결과와 동일하게 양성 샘플들을 확인할 수 있었음.
- 양성으로 확인된 야외주 조류독감 바이러스를 유정란을 이용하여 배양을 수행하였음.
- 각각 총 20 ml 이상의 바이러스 배양액 (요막강액)을 확보하였으며 바이러스 보존액 (25% Glycerol in PBS)을 혼합하여 -80 °C에 보관하였음.

○ 임상시료를 이용한 감염 샘플 제작

- 확보한 임상시료를 이용하여 키트 테스트에 사용할 수 있는 감염샘플을 확보하기 위하여 4주령 병아리에 야외주 인플루엔자 바이러스를 intranasal inoculation 하고 2~3일 후 분변을 수집하여 바이러스 유무를 확인함.
- PCR과 ELISA를 수행하여 분변에서의 인플루엔자 바이러스 유무를 확인해본 결과 두 가지 실험에서 모두 양성의 결과를 확인함



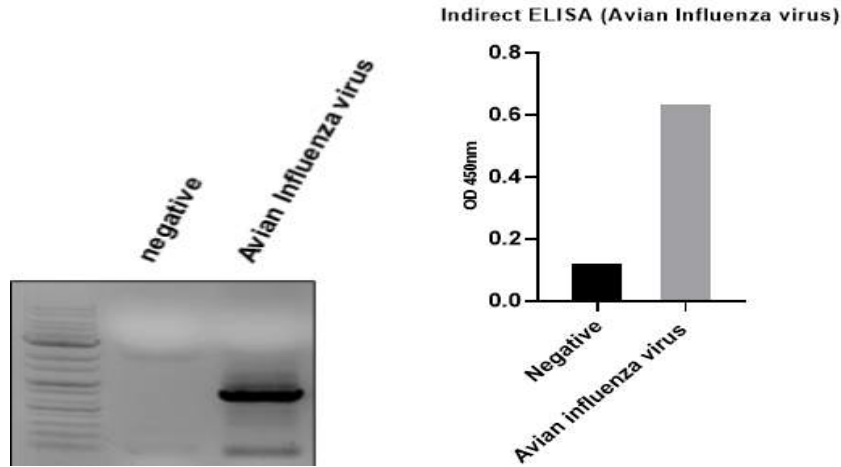


그림 53 PCR (왼쪽) 및 ELISA(오른쪽). 임상시료를 이용한 감염시료제작 확인

- 수집한 분변 샘플로부터 바이러스 분리를 성공적으로 했으며 이를 감염시킨 병아리에서도 바이러스가 분변으로 배출되는 것으로 확인하였음.
- 분변 샘플은 PBS에 희석하여 시료 전처리 실험 및 키트 적용 샘플로서 이용하기 위해 -80 °C에 보관하였음

#### (6) 시료 전처리 기술 최적화

##### ○ 시료 전처리 기구 최적화

- 분변샘플을 PBS에 희석하고 이를 키트에 적용하기 위한 시료전처리 방법에 대한 연구를 수행하였음.
- 1차년도 연구수행에서 제작한 시료전처리 기구를 이용하여 분변샘플을 필터하고 필터 전과 후의 바이러스 양을 ELISA를 통하여 확인하였음.

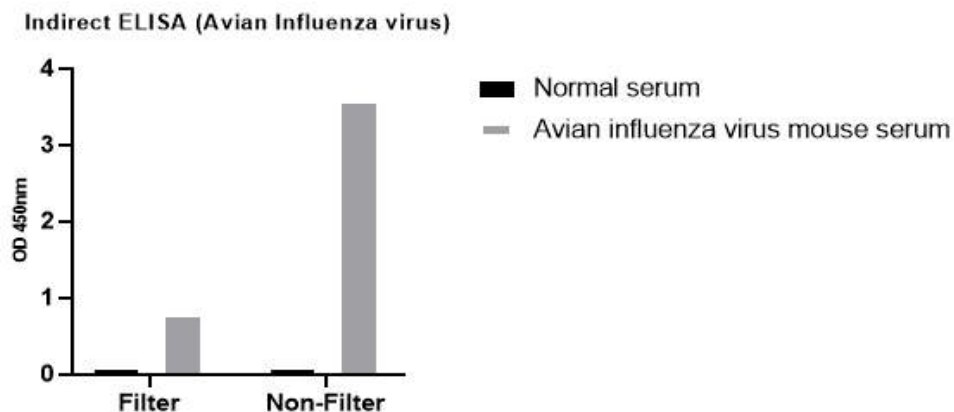


그림 54 PBS에 희석된 분변샘플의 필터 전과 후의 바이러스 양 비교

- 1차년도에서 개발한 기구를 이용한 필터에서는 바이러스의 양이 필터 전에 비해서 78% 정도 줄어드는 것으로 확인하였음.

- 바이러스가 PVDF membrane 필터에 흡착되는 등의 문제가 있었을 것으로 예상되어 단백질의 흡착을 방지할 수 있는 셀룰로스 아세테이트 membrane 필터를 구매하여 실험을 수행하였음.



그림 55 단백질의 흡착율이 낮은 상용화된 필터를 이용한 분변샘플 필터링

- 위의 필터를 이용하여 분변샘플을 필터하고 조류인플루엔자 바이러스 단클론 항체를 이용한 ELISA와 M1 유전자에 대한 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 필터 전과 후의 바이러스 양을 확인하였음.

**Indirect ELISA (Avian Influenza virus)**

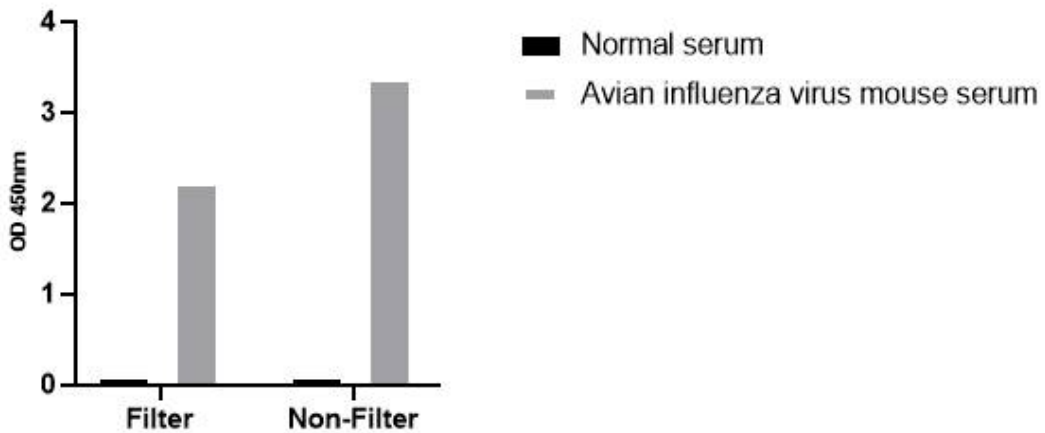
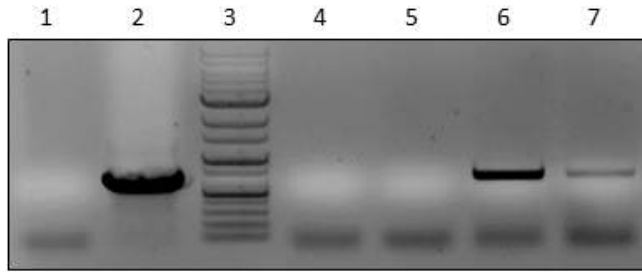


그림 56 PBS에 희석된 분변샘플의 필터 전과 후의 바이러스 양 비교를 위한 ELISA



- 1 : Non template control
- 2 : Positive
- 3 : Size marker
- 4 : Negative sample non filter
- 5 : Negative sample filter
- 6 : Avian influenza non filter
- 7 : Avian influenza filter

그림 57 필터 전과 후의 바이러스 양 비교를 위한 M1 유전자에 대한 RT-PCR

- ELISA 결과로 비교해본 결과 앞서 고안했던 기구보다 구매하여 사용한 필터의 바이러스 손실량이 30%로 훨씬 더 적은 것으로 확인하였음.
- PDVF membrane 대신 셀룰로스 아세테이트 membrane을 사용하면 분변시료의 전처리 과정에 바이러스 손실을 최소화하고 진단 키트에 적용 가능한 샘플을 준비할 수 있었음.

○ 상용 키트를 이용한 시료 전처리 기구 검증

- 필터 전과 후의 분변 시료를 시판되고 있는 상용 키트를 사용하여 검증한 결과 필터 전과 후에서 모두 양성 결과를 보였음.

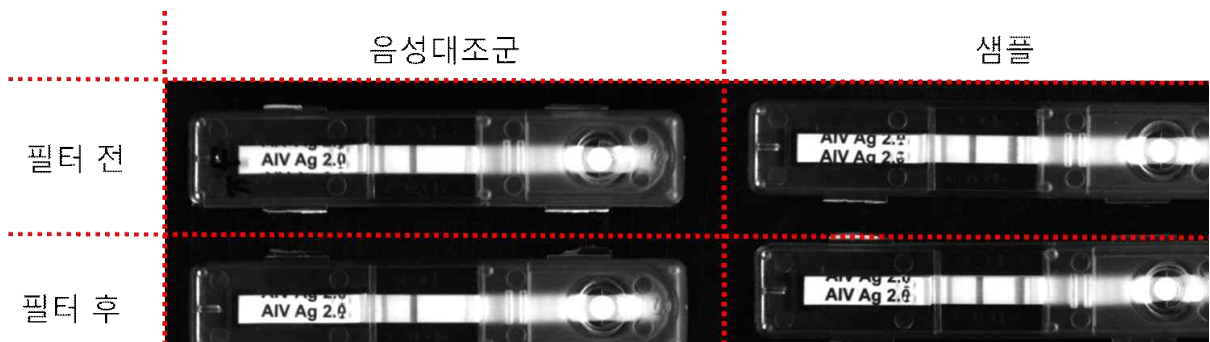


그림 58 상용 키트를 사용한 필터 전과 후의 분변샘플 검증

## 2-3. 협동연구기관 ((주)씨맥)

(1) 시간에 따른 화학발광 신호 측정 HW 및 SW 개발

- 화학발광 측정 시간을 최적화하기 위해 진단기기에 사용 예정인 Linear CCD Array Sensor를 이용한 Time Series 측정의 HW 및 SW를 개발하여 신호 변화를 측정함.

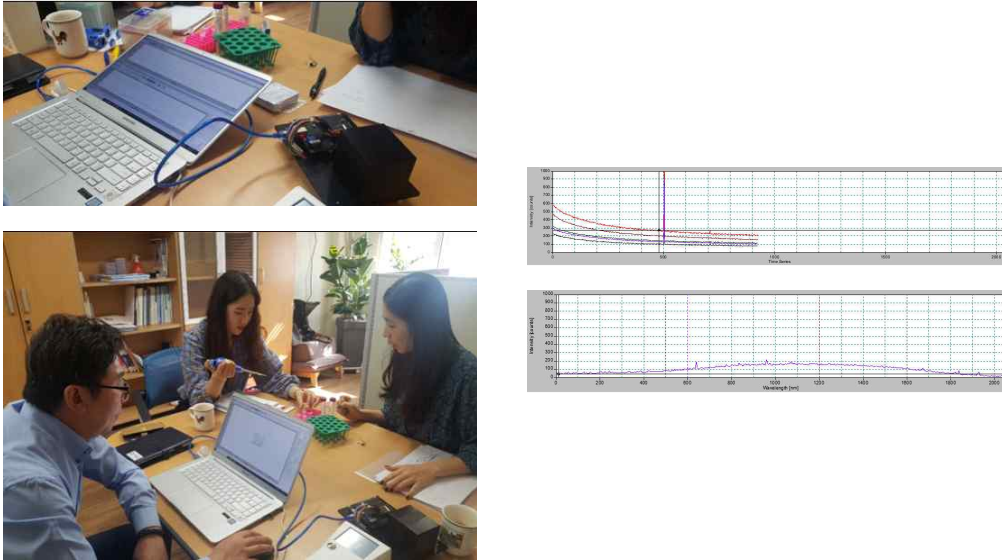


그림 59 Time series 측정 HW 및 SW 연동 실험 모습 및 결과

(2) 시간에 따른 화학발광 신호 측정 실험 결과

- 시간에 따른 화학발광 신호의 변화를 측정한 결과 반응 후 약 6분 후 50%로 신호가 감소하는 것을 확인하여 반응 후 4분 이내 측정하는 것을 목표로 정함

Signal Change of CL with Times

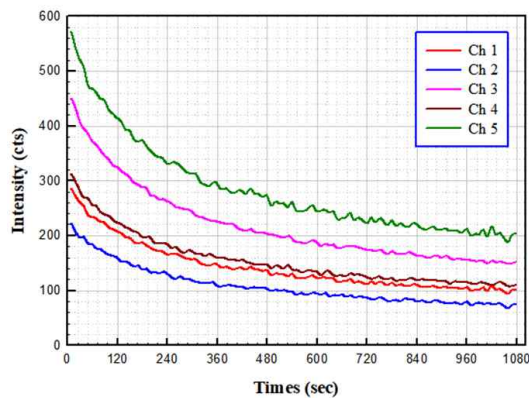


그림 60 시간에 따른 화학발광 신호 측정 실험 결과

(3) Linear Array Sensor를 이용한 POCT 진단기기 개발

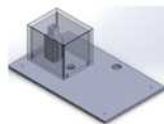
- 화학발광의 신호가 작고, 시간에 따라 화학발광 신호가 감소하기 때문에 Control, Test 1 및 2의 신호를 동시에 측정하여야 하기 때문에 고감도 Linear CCD Sensor를 선정함
- 선정된 Linear CCD Sensor는 Sony사의 ILX511과 554B로 Pixel크기는 14umX200um(54um)이며, 2048의 Pixel을 가지고 있어 실시간 동시 측정이 가능함
- Linear CCD Sensor의 신호 획득, Touch LCD를 이용한 구동, USB통신 및 LED 제어를 위한 전자보드의 회로 설계, PCB 제작 및 구동을 위한 FW 및 SW를 개발함
- 화학발광 신호의 검출을 위해 카메라 렌즈, 밴드패스 필터, 센서 장착 및 스트립 로딩을 위한 광학부와 스트립 홀더 등을 제작 및 최적화하여 테스트를 진행함
- 광학부, 스트립 홀더 등과 연계된 시제품의 케이스를 설계 및 제작하여 진단기기개발을 완료하여 테스트 진행함



테스트용 스트립 홀더 (1차/2차)



테스트용 광학계



Time Series 측정용 기구 설계 파일



Time Series 측정 HW/SW



센서 보드



제어보드



진단기기 상부 (LCD 및 LCD 제어보드)



진단기기 하부 (광학계, 제어보드, 홀더)



화학발광진단기기 프로그램 테스트



화학발광진단기기 시제품 모습

그림 61 개발된 진단기기 및 테스트용 제품의 산출물

(4) Linear Array Sensor를 이용한 POCT 진단기기 실험

- 테스트용으로 제작된 시제품 및 스트립 홀더를 이용하여 화학발광 신호를 측정함
- 화학발광 스트립의 신호가 미세하여, 멤브레인을 이용한 스트립에서 용액을 측정하는 방식으로 변경하여 용액을 측정할 수 있는 스트립 홀더를 제작하여 테스트를 진행함
- 진단기기의 상품성 및 편리성을 높이기 위해 신규 디자인을 적용한 시제품을 설계 및 제작하였고, 구동 및 운영 프로그램을 보강하였음
- 선정된 Linear CCD Sensor를 이용할 시 신호의 동시 측정은 가능하였으나 민감도의 개선 필요성에 의해 2차년도 고감도 센서를 선정하여 민감도 개선을 추진을 기획함



그림 62 개발된 진단기기를 이용한 측정 실험

(5) 측정감도 개선을 위한 시제품 최적화

- 1차년도 개발된 진단기기의 측정 및 설정과 관련된 프로그램의 개선 및 최적화를 진행하여 제품의 완성도를 높임
- 측정 재현성을 증대하기 위해 데이터 획득 시 신호 평균, 인접 Pixel의 평균 등을 통해 측정 재현성을 증대하는 알고리즘을 넣음
- 측정의 민감도를 개선하기 위해 스트립 홀더를 개선하였으며, 화학발광 신호의 사전 검증을 위해 야광 물질을 통해 광학계를 튜닝 하는 공정을 확립함



그림 63 개선된 시제품을 이용한 측정 이미지

(6) 전자보드 제작 (TE Cooled Back-thinned CCD)

- 1차 년도에 개발한 진단기기는 Linear Array Sensor중 Front-illuminated CCD로 실험을 진행하면서 민감도의 개선이 요구되어 민감도 개선 및 실시간 측정을 위해 Back-thinned CCD Type의 Linear Array Sensor를 검토하여 개발을 진행함
- Back thinned CCD 이론적 특성
  - 파장에 따른 Quantum efficiency 비교 : 아래 그림과 같이 선정된 Back-thinned CCD의 경우 Quantum efficiency가 Front illuminated CCD에 비해 2배 이상 높아 민감도 향상이 기대됨

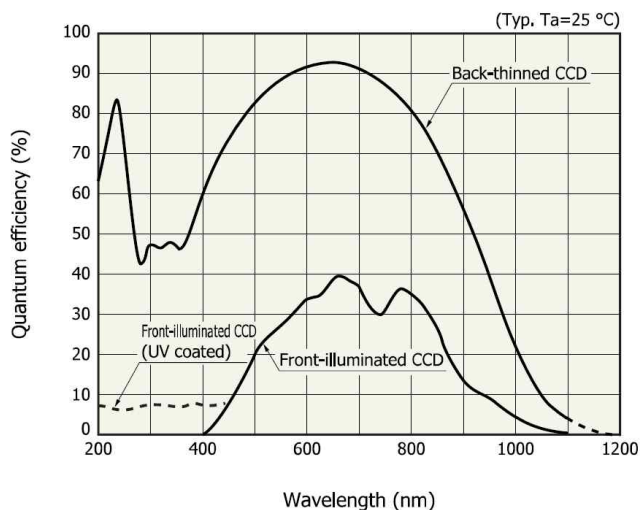


그림 64 Back thinned 와 Front illuminated 의 성능 비교

- Back thinned type & Front type 구성 비교

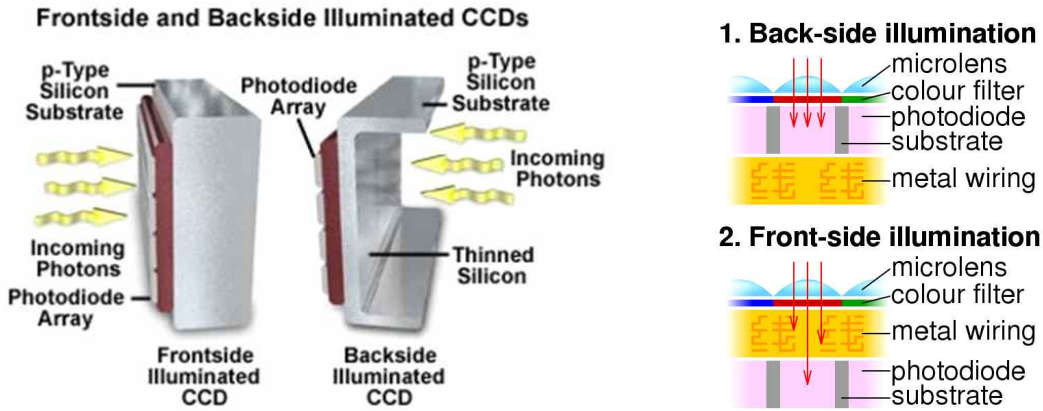


그림 65 Back thinned 와 Front illuminated 의 구조비교

○ TE-Cooling Back thinned CCD 기본 동작 테스트

- CCD 신호 획득 제어 보드와 기본 동작 테스트 프로그램 개발 후 기본 동작 테스트를 진행하였음



그림 66 TE-cooling Back-thinned CCD test - Open

- CCD를 모두 Open한 상태에서 <Measure> 버튼을 클릭하고 측정되는 데이터를 관측함. 현재 Expose 값은 외부 광에 의해 모두 Saturation 되는 현상이 나타남.



그림 67 TE-cooling Back-thinned CCD test - 1/2 Open

- 절반 정도를 가리고 측정 함. 손으로 가려지지 않은 부분인 끝 부분에서는 측정 값이 Saturation 되는 현상이 나타나고, 가림 막에 의해 가려진 부분에서는 신호가 떨어지는 현상을 확인함.





그림 68 TE-cooling Back-thinned CCD test - Closed

- Sensor를 가려놓고 측정하여 센서의 측정 Pixel 값이 Base 상태로 낮아짐을 보임.
- PCB 설계 및 제작 - PCB설계도
  - MCU, LCD, Bluetooth

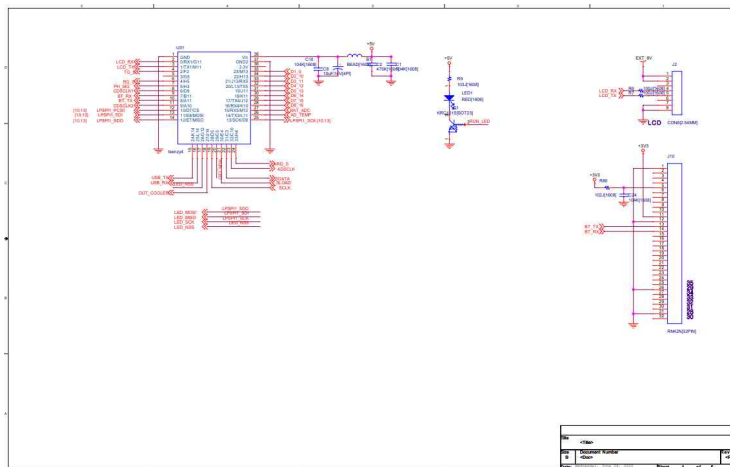


그림 69 MCU, LCD, Bluetooth에 대한 PCB설계도

- PC & USB 통신

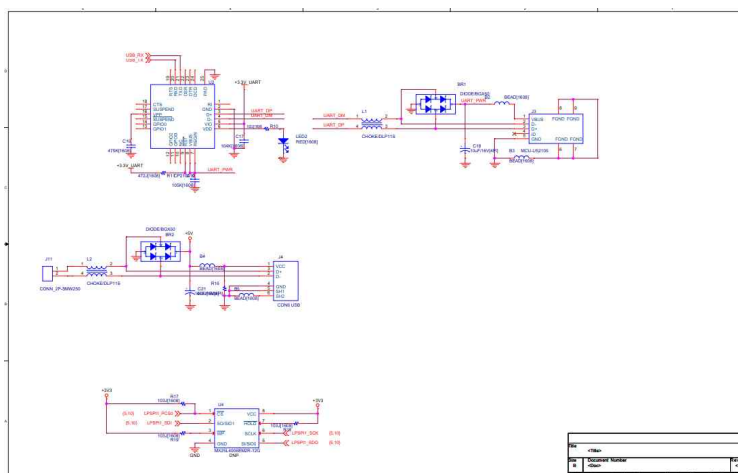


그림 70 PC & USB 통신에 대한 PCB설계도

- Power Part (Main, peltier, CCD)

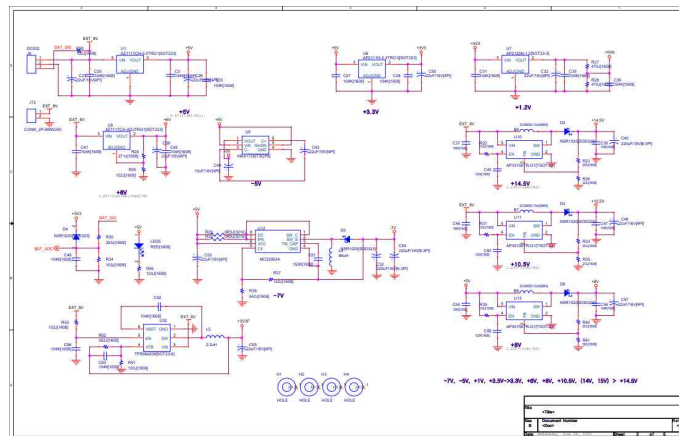


그림 71 Power Part (Main, peltier, CCD)에 대한 PCB설계도

- CCD clock control, LED Control current

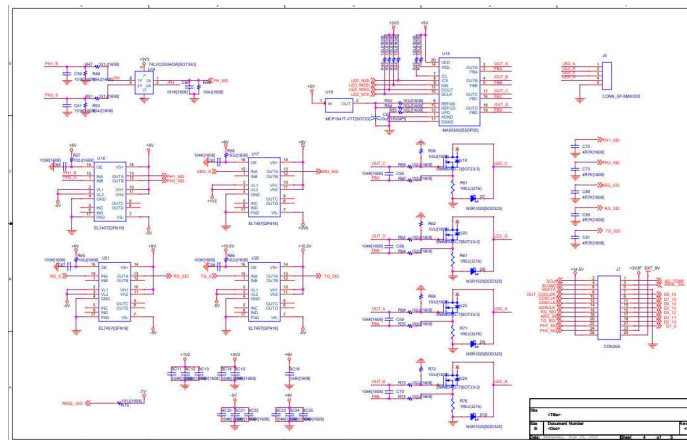


그림 72 CCD clock control, LED Control current에 대한 PCB설계도

- Sensor board (ADC, OP-Amp, Peltier control)

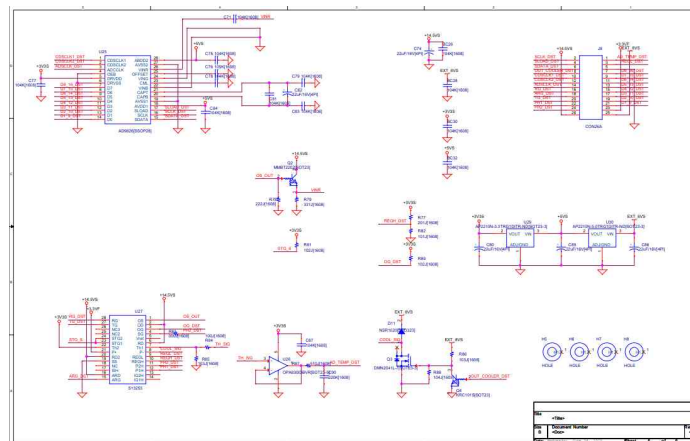


그림 73 Sensor board (ADC, OP-Amp, Peltier control)에 대한 PCB설계도

○ PCB 설계 및 제작 - Gerber file (PCB부품 배치도)

- Top & Bottom 회로도

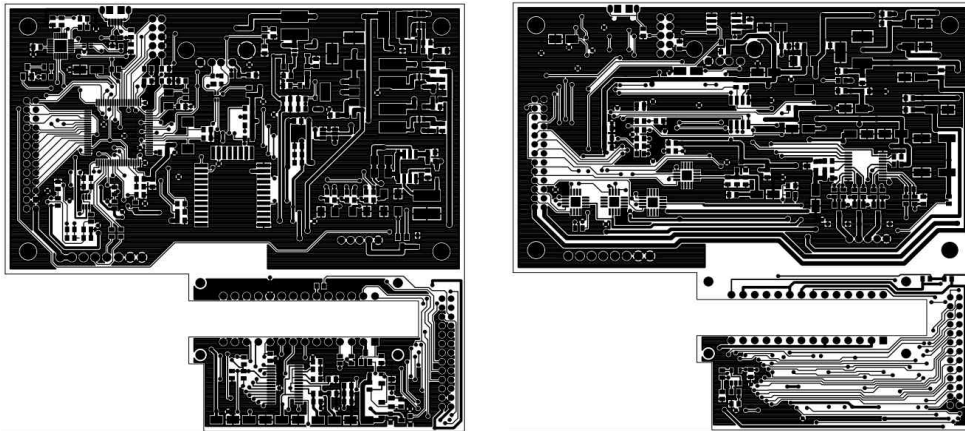


그림 74 Top(좌) & Bottom(우) 회로도에 대한 Drawing 이미지

- Top & Bottom Silk layer

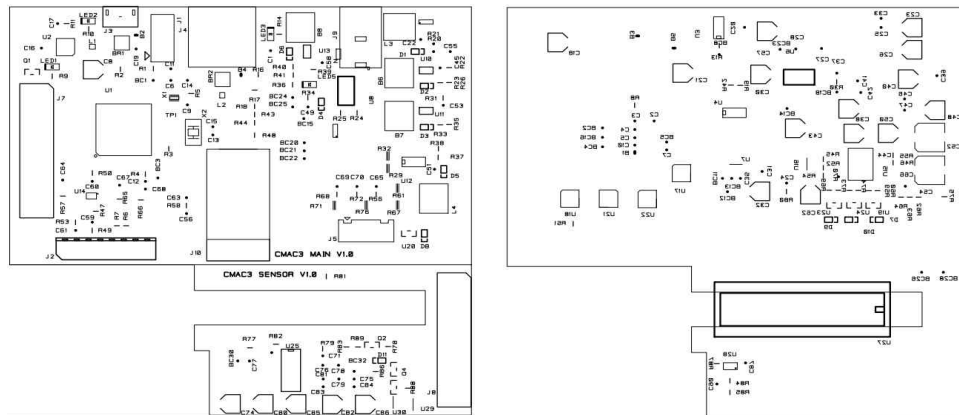


그림 75 Top(좌) & Bottom(우) Silk layer 회로도에 대한 Drawing 이미지

- Top & Bottom 부품 배치도

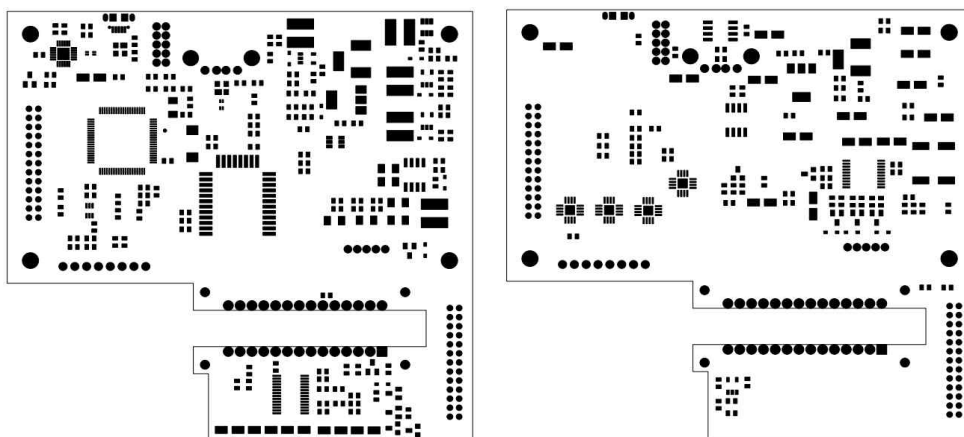


그림 76 Top(좌) & Bottom(우) 부품배치도에 대한 Drawing 이미지

○ PCB Total layer (4 layer)

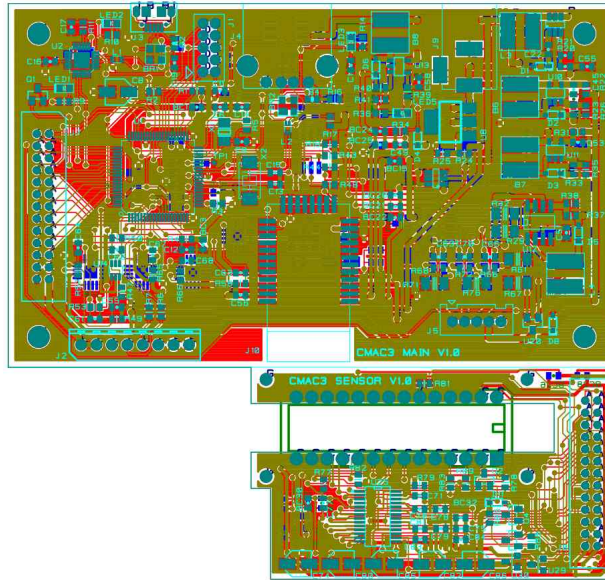


그림 77 PCB Total layer (4 layer) Top에 대한 Drawing 이미지

○ PCB Product (Top & Bottom)

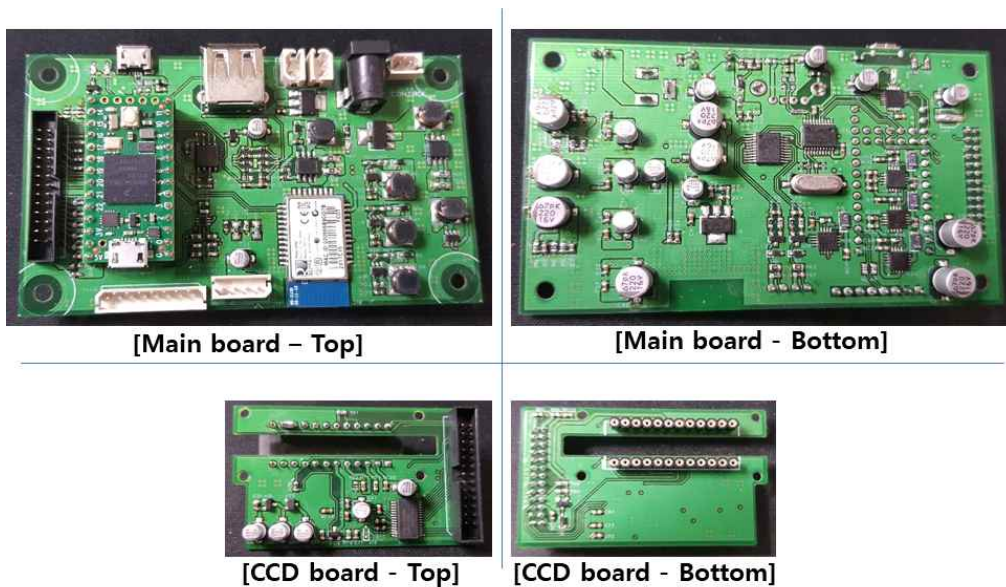


그림 78 PCB Product (Top(좌) & Bottom(우)) 실물에 대한 이미지

(7) 프로그램 개발 및 제작

○ Touch LCD의 크기를 1차년도 3"에서 2차년도 4.3"로 크기를 변경하여 고객의 사용 편리성을 증대하였으며, 측정, 장비 설정, 데이터 전송, 검량식, 데이터 전송 등의 기능에 따라 GUI 및 프로그램을 개발하여 적용 및 테스트하였음. 신호의 측정 재현성 및 정확도 개선을 위해 알고리즘 도입

○ UI 기본이미지

- Main: 주요 기능 창

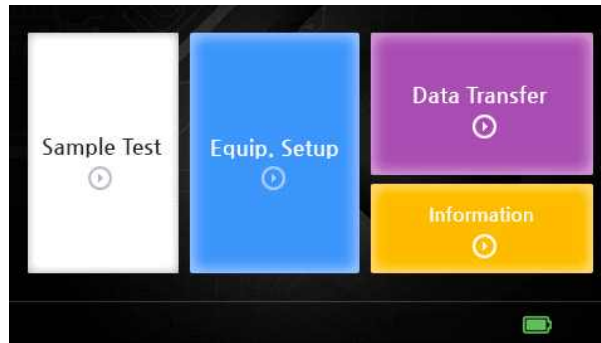


그림 79 Main UI 이미지

- Test mode Setup: CCD 제어 및 데이터 획득 설정 창

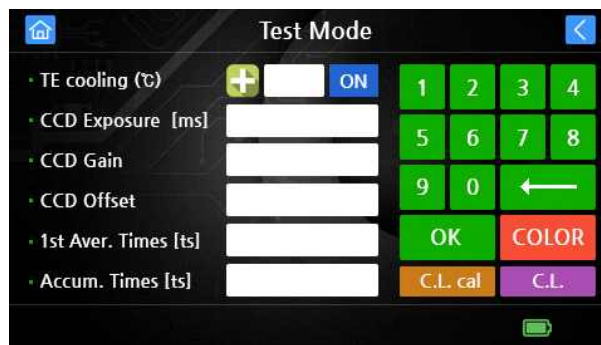


그림 80 Test mode Setup UI 이미지

- Measurement: 스트립 측정 창

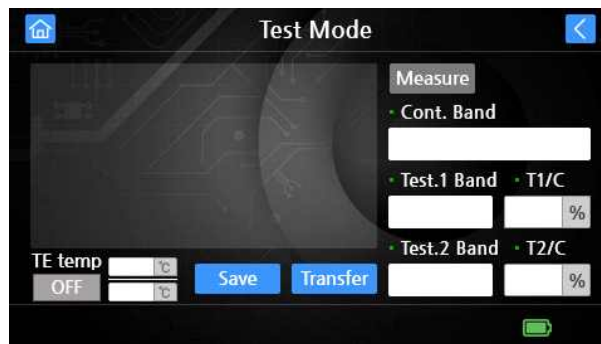


그림 81 Measurement UI 이미지

- Equipment Setup: 장비 설정 창 (밴드 설정 및 LED 전류 값)

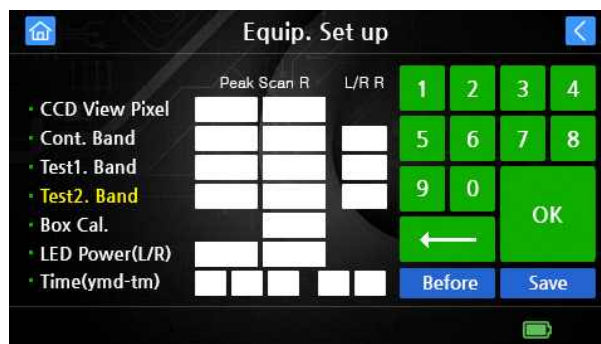


그림 82 Equipment Setup UI 이미지

- Information & Fitting: 장비 정보 및 검량식 설정 창

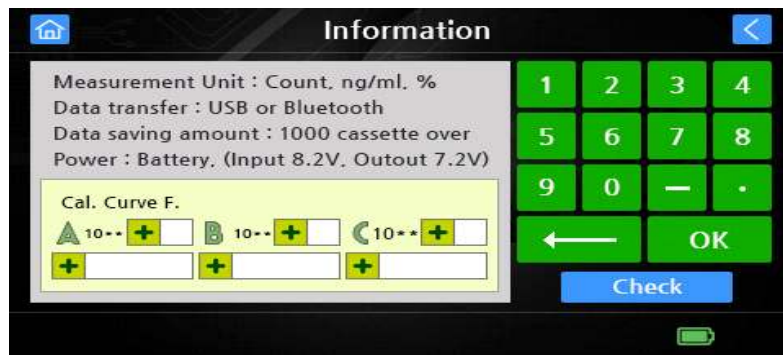


그림 83 Information & Fitting Setup UI 이미지

- Data Select & Transfer: 데이터 선정 및 전송 창

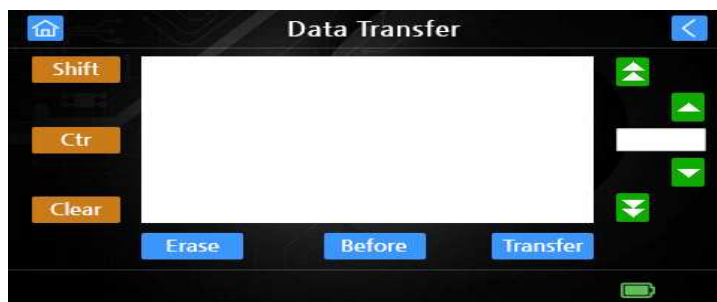


그림 84 Data Select & Transfer Setup UI 이미지

- Saving Report



그림 85 Saving Report Setup UI 이미지

- 문자 입력 Key board

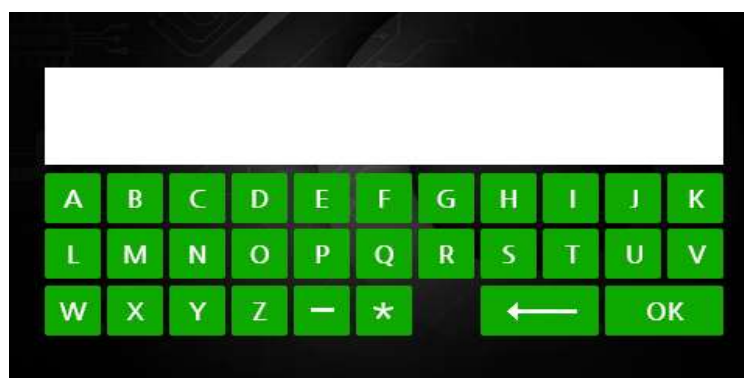


그림 86 문자 입력 Key board UI 이미지

- Data transfer choice



그림 87 Data transfer choice UI 이미지

○ Sample Test를 위한 UI 순서도

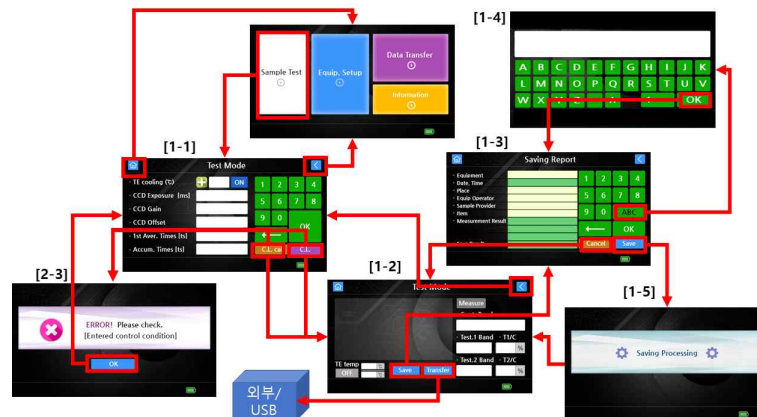


그림 88 Sample Test를 위한 UI 순서도 이미지

○ Equipment Set up을 위한 UI 순서도

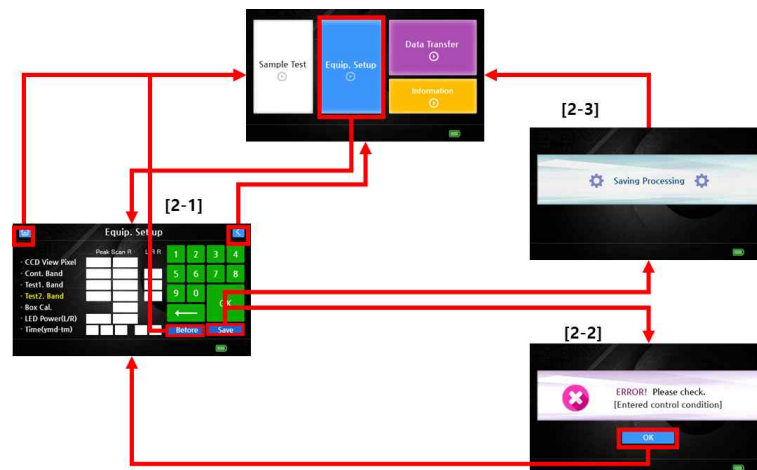


그림 89 Equipment Set up을 위한 UI 순서도 이미지

○ Data Transfer를 위한 UI 순서도

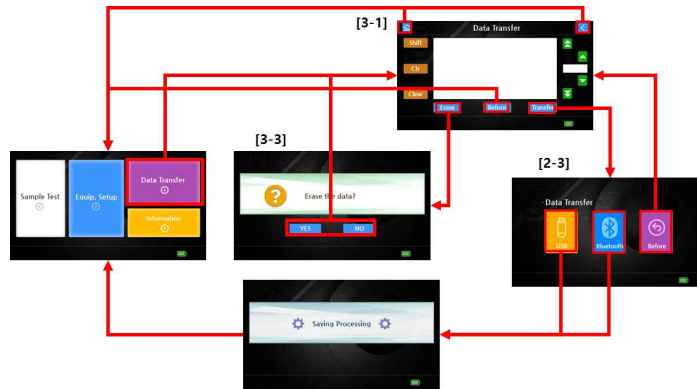


그림 90 Data Transfer를 위한 UI 순서도 이미지

○ Information & Fitting을 위한 UI 순서도

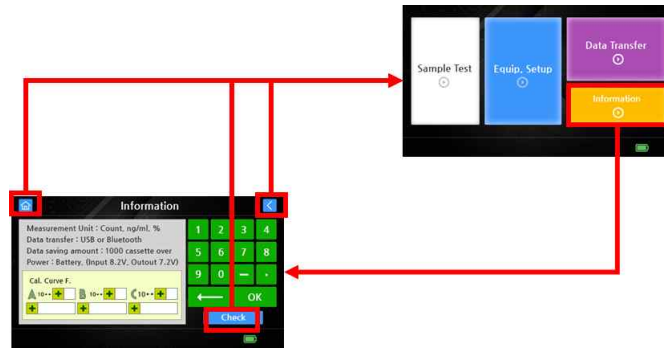


그림 91 Information & Fitting을 위한 UI 순서도 이미지

○ PC SW를 통한 장비의 튜닝 및 데이터 확인

- 개발된 장비의 최적화, 생산을 위한 튜닝 및 데이터 확인을 위해 PC SW를 개발함

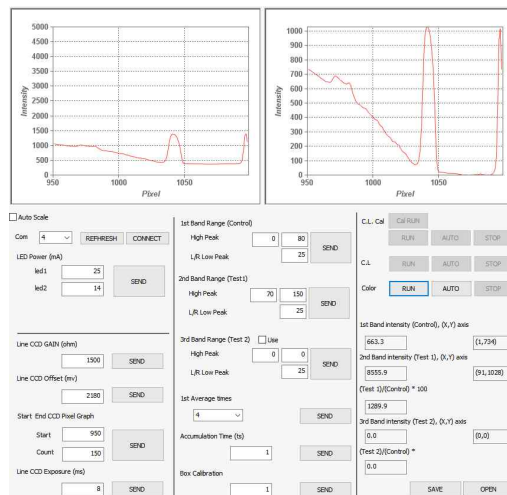


그림 92 튜닝 및 데이터 획득용 PC 프로그램



(8) 광학부 제작

- 1차년도 개발 진단기기 에서 파악된 문제점을 해결하기 위해 횡축 광 경로 측정기기 에서 샘플 Loading/Un-loading, 초점거리 조절, 샘플 위치 조절 및 용액 시료에 따른 불편함을 해결하기 위해 종축 광 경로 측정기기 구조를 개발함으로써 이와 같은 문제점을 해결할 수 있었음
- 추가적으로 진단기기의 응용 확장성 및 장비 성능 검사를 위해 발색 및 형광의 시료 측정도 가능하도록 조명 광학계를 개발 장착하여 장비의 성능 검사를 실시함
- 또한 외부로부터 유입되는 떠돌이 광을 차단하기 위해 요철 형식의 내부 격벽을 추가하고, 광학부에 별도의 암상자화를 설계 제작함으로써 떠돌이 외부 유입 광에 의한 신호왜곡 및 노이즈를 배제함으로써 성능을 향상시킴
- 선형 LED 광원 및 광학 기구 테스트
  - 선형 LED 광원 On 테스트
  - 선형 LED를 양방향에 설치하고, 전압을 인가하면서 LED사용 전압 범위를 측정함. 보드 제작 시 전류 제어를 프로그램에서 제어 가능하도록 하여 편리성 강화
  - 샘플이 장착된 내부 광학계로서, LED의 Light source가 샘플에 입사되어 반사된 빛이 CCD가 채결될 광학 렌즈 방향으로 직접적으로 입사되지 않도록 설계 구성함. 따라서 LED 광이 샘플에 반사광학렌즈 Part에 별도의 광 가림 막 설치도 적정함.

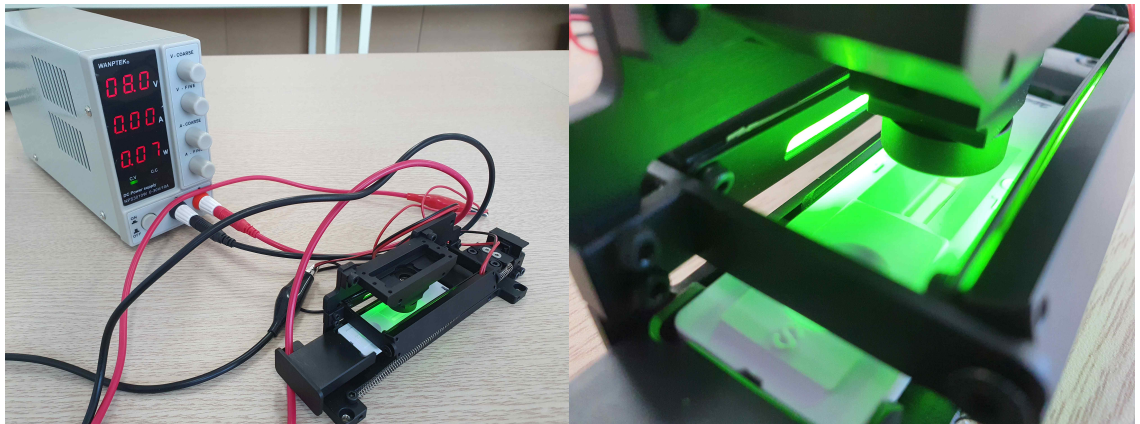


그림 93 선형 LED 적정 전압인가 테스트 및 LED 조사 상태

- 암상자화
  - 암상자 부품 제작 및 가 조립



그림 94 내부 부품 설계 및 가공조립 (방열판 포함)

- 추가 보조 암상자 (외부암상자)



그림 95 외부 암상자 추가 설치 이미지

(9) 시제품 제작

○ 시제품 케이스 디자인



그림 96 시제품 케이스 시안

○ 제품 설계 3D 모델링

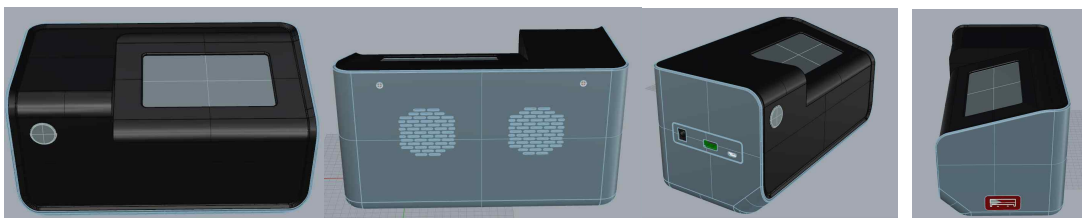


그림 97 렌더링 정면, 후면, 좌측면 및 우측면 이미지

○ 실제 시제품 제작 사진 및 무선 통신 사진



그림 98 실제 제작된 시제품 및 무선 통신 이미지

(10) 시제품 평가

○ 표준 발광 물질 측정 결과

- 표준 발광물질을 이용하여 Base Line Correction이 정확히 일어나는지 확인함



그림 99 표준 발광 물질을 이용한 시제품 평가

○ 발색 스트립을 이용한 측정 결과

- 샘플 준비 및 테스트



그림 100 실제 제작된 측정 표준 샘플 앞면(좌), 뒷면(우) 이미지

- 시제품 Loading / Unloading 이미지



그림 101 실제 측정 표준 샘플을 Loading한 이미지

- 샘플 측정 결과 : 발색 표준 스트립을 이용하여 측정한 결과, 측정 재현성은 CV 0.42%를 얻어 재현성이 확보됨

	Control	Test Line	T/C ratio
1	9423	7093	0.75
2	9422	7048	0.75
3	9422	7068	0.75
4	9367	6998	0.75
5	9425	7059	0.75
6	9411	7028	0.75
7	9471	7040	0.74
8	9412	7068	0.75
9	9429	7071	0.75
10	9452	7042	0.75
11	9447	7095	0.75
12	9451	7098	0.75
13	9438	7051	0.75
14	9399	7065	0.75
15	9382	7052	0.75
16	9420	7069	0.76
17	9443	7131	0.75
18	9432	7031	0.75
19	9437	7047	0.75
20	9460	7035	0.74
평균	9427.2	7059.5	0.74
표준편차	25.278	29.616	0.003
CV	0.268	0.419	0.422

- 샘플 측정 결과 : 개발된 시제품을 이용하여 충남대에서 개발한 조류인플루엔자 측정 샘플을 측정하여 샘플 측정이 가능함을 확인함



그림 102 조류 인플루엔자 측정 샘플 테스트 이미지

(11) 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작

○ 신호 정량화

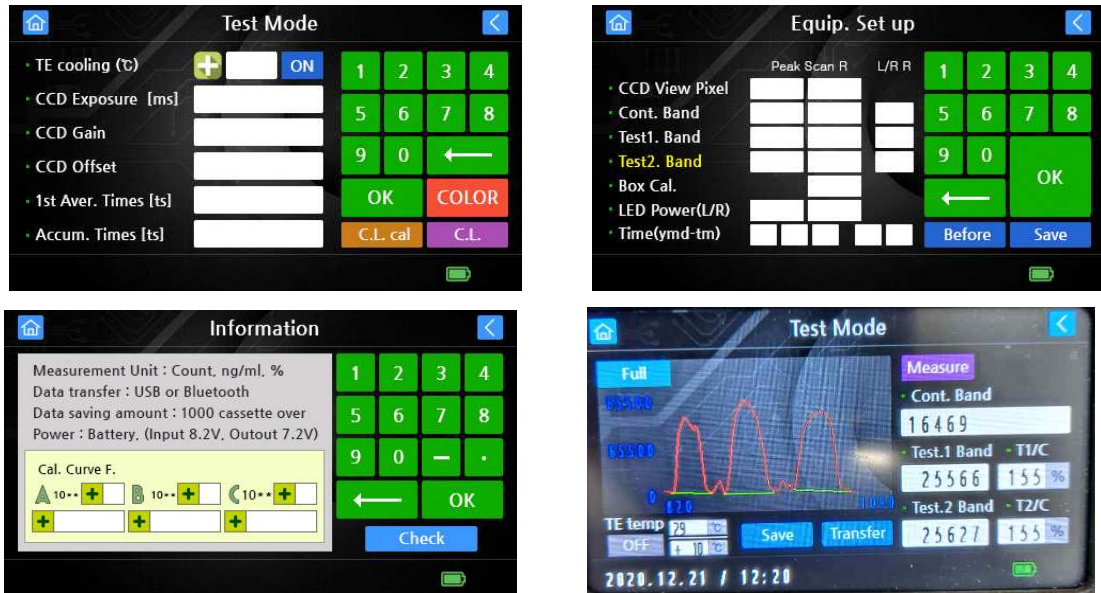


그림 103 신호 정량화를 위해 구현된 GUI 및 측정 사진

- 신호의 측정 재현성을 높이기 위해 신호 획득 후 상하한 값을 10%버리고 평균값을 취하는 Average 기능, Pixel의 X축을 이동 평균하는 Boxcar 알고리즘, 미세 신호의 증폭을 위해 Base Line을 차감하고 신호를 더하는 Accumulation 기능의 알고리즘 적용을 통해 신호 측정의 재현성을 증대하였음
- 측정 영역인 Control, Test 1 및 Test 2는 Auto Band Peak Search 알고리즘을 적용하여 밴드 위치를 정확히 검출한 후 Weight End Point 알고리즘을 적용하여 Base Line Correction을 하여 신호의 정확도를 높였음
- 측정 재현성 및 정확도를 달성 후 2차식의 검량식을 통해 정량화 구현이 가능하게 개발함

○ IoT 구현

- 데이터의 전송 방법을 USB 메모리, 블루투스 통신 방법으로 구현하였음
- 아래의 그림은 무선 블루투스 통신 방법을 통해 데이터를 스마트폰으로 전송하여 확인할 수 있는 실험 결과를 보여주는 데이터로 장비와 스마트폰 간의 IoT구현을 통해 데이터 확인이 가능함



그림 104 블루투스 통신을 통한 데이터 전송 및 확인

○ PMT를 이용한 비교 테스트용 기기 개발

- 센서 및 프로그램 제어보드 개발 : 실험의 편리성과 개발될 진단기기와의 민감도 비교를 위해 PMT 센서를 이용하여 화학발광 신호를 측정할 수 있도록 테스트용 기기를 기획하고 개발하여 연구활동에 사용함

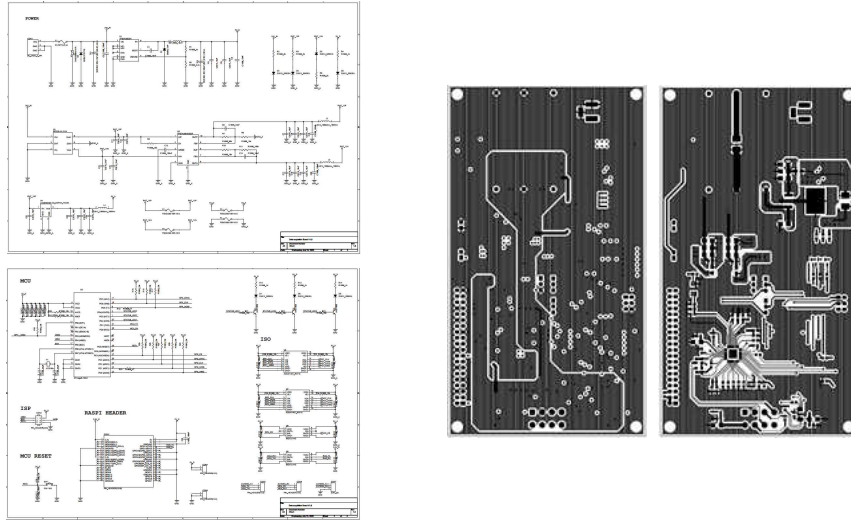


그림 105 회로도(좌) 및 거버(우)

- 광학부 및 케이스 설계 및 제작

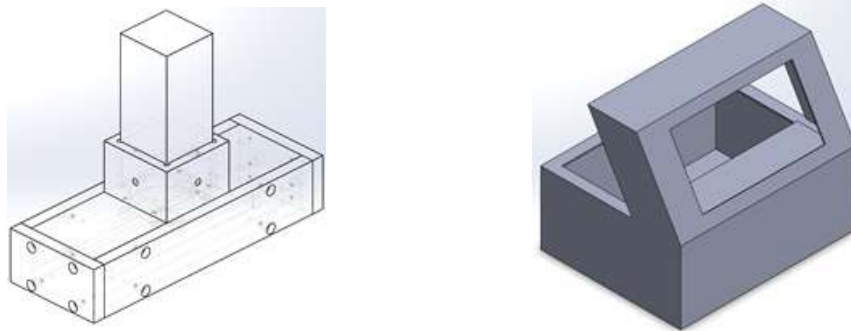


그림 106 광학부(좌) 및 케이스(우)

- 센서 신호 획득 및 디스플레이 프로그램 개발
- 측정기 제작 및 테스트: Band Pass Filter의 적용 유무에 따른 비교 실험 수행



그림 107 측정기 이미지

- 비교 실험 및 개선

① 개발된 PMT 측정기는 연구에 사용되는 상용 제품과 비교 평가를 진행하였음

농도	측정 결과값 (cts)	
	C-MAC	상용 장비
100,000	360,000	26,400,000
10,000	37,000	2,170,000
1,000	3,500	301,000
100	2,200	62,700
10	1,900	17,000
1	1,800	3,100

② 개발 장비의 농도 선형성: 측정 농도 범위에서 상관계수 0.9999의 선형성을 보임

**C-MAC**

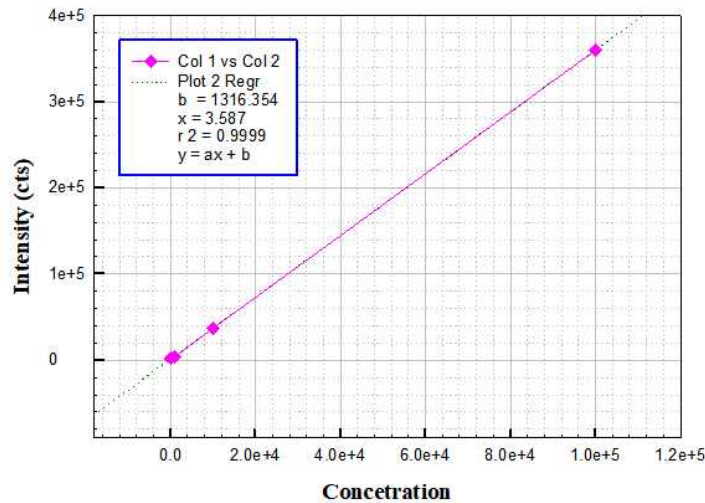


그림 108 농도 선형성 측정

③ 민감도 개선을 위한 스트립 홀더 설계 및 제작 : PMT 장비에서 사용하는 스트립 홀더의 경우 절대적인 용액의 부피가 작아 화학발광 신호가 작음

⇒ 측정 용액의 절대 부피 개선 ⇒ 신호 ↑

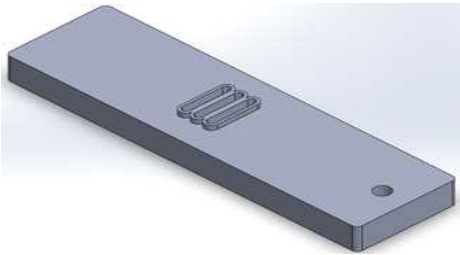
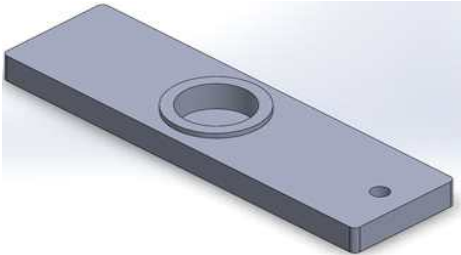
기존 홀더	개선 홀더
	
1개 Well의 부피 = 67.5uL	Well의 부피 = 565 uL

그림 108. 기존 홀더(좌) 및 개선홀더(우)

(12) 경제성 평가 및 판로 확보

○ 주요시장 분석 및 전망

- 치료에서 진단과 예방으로 의료 패러다임 변화에 따른 체외진단 산업 급성장
  - 최근 신종질병의 출현, 감염질병의 유행과 인구고령화로 조기진단의 중요성이 커지면서, 의료 패러다임이 치료에서 진단과 예방으로 전환됨에 따라 체외진단 산업과 관련된 시장 급격히 성장
  - 전 세계적으로 진단 및 분석 기술의 발달로 변화 속도가 더욱 가속화 되는 추세로, IT 및 BT/NT 융합 기술경쟁력을 기반으로 진단의 정확성과 신뢰성, 그리고 효율성 확보 필요
  - 체외진단기기는 소형화, 자동화, 검사효율성, 모듈화, 경제성, 사용자 편의성, 심미성 등의 경쟁력 확보 필요함.



그림 109 글로벌 헬스케어 영역별 비중: Frost & Sullivan, 2016

- ICT와 융합한 차세대 진단시스템 수요 증가
  - 질병 초기상태에서 정확한 진단을 위해 고감도 진단기술을 위한 기술 및 장비 개발 등이 중요하며, 특히 신규 바이오마커의 발굴, 기능 확인, 임상검증을 통한 특허 및 기술력 선점 요구
- 의료분야 트렌드가 치료중심에서 예방중심으로 변화함에 따라서 검사의 적정성과 의료비용 최소화가 중요한 부분으로 대두되고 있고, 현장진단검사 및 분자진단 기술에 대한 수요 증가 (2019년 신개발 의료기기 전망 분석 보고서, 식품의약품안전평가원)
  - Mordor Intelligence사의 글로벌 체외진단 시장 보고서(2018-2023)에 따르면 매출 규모 면에서는 분자진단기기, 면역화학진단기기, 자가혈당측정이 주요하게 큰 비중을 차지하고 있지만, 성장률 면에서는 분자진단, 현장진단(POCT), 지혈진단의 순서로 가파른 성장세를 보임
- 최근 메르스와 코로나19 등과 관련된 신종 감염병이 등장함에 따라 바이러스 진단 기술의 연구개발 및 출원 활동 활발해질 것으로 예상 (특허청, 2020.02)
  - 특허청에 따르면 최근 20년(2000~2019) 인체 감염 가능성이 있는 코로나바이러스에 대한 진단기술 총 64건(내국인 56건) 출원
  - 2002년 첫 보고된 사스 유발 코로나바이러스(SARS-COV) 관련 진단 기술 19건이 출원, 2015년 국내 전파된 메르스(MERS-CoV) 관련 진단기술은 총 33건



출원

- 코로나바이러스 진단기술은 두 가지로, 항원-항체 반응 이용 진단기술(30분 내외 소요) 32건(내국인 25건), 실시간 유전자 증폭(PCR) 이용 진단기술(6시간 내외 소요) 33건(내국인 31건) 출원
- 인플루엔자 바이러스 경우 항원-항체 반응 진단 기술이 132건으로 타미플루 같은 치료제가 개발돼 있어 진단과 치료가 동시에 진행

○ 마케팅 믹스 (4P)

마케팅 믹스	세부전략
제품 (Product)	경쟁우위의 원천은 품질( <b>범용성, 신속성, 정확성</b> )과 가격( <b>저가우위</b> )에 있으므로 제품의 넓이와 깊이는 단순함. 단일 제품라인을 구성하여 시장반응을 통해 개선품 개발함.
가격 (Price)	가격우위 달성을 위해 가급적 단순한 프로모션 전략을 수립함. 기존 래피드 킷 제조업체와의 협력을 통해 원가절감이 필요함.
유통 (Place)	가격우위를 위해 직접유통보다 <b>전문화된 간접유통 채널</b> 을 활용 국내외 관련 전시회 등을 통해 의료기기 유통업을 적극 활용하여 제품 홍보 및 유통함.
촉진 (Promotion)	전문화된 제품으로 인적판매에 집중함. 각종 해외 박람회를 통한 <b>지속적인 홍보와 마케팅</b> 추진함. (중국 심천, 상해, 독일, 방콕 등의 의료기기 박람회 등) 수출을 위한 제품 경쟁력: 의료와 보건의에 대한 사회적 시스템이 아직 잘 갖춰지지 않은 중국, 동남아시아지역, 남미지역 등에서는 본 개발 기술이 높은 효과를 얻을 것으로 전망 해외시장(또는 고객) 발굴을 위한 정보수집 활동: 국내에서 열리는 기술 박람회 및 해외의 여러 박람회에 참관, 참가함으로써 래피드킷 정량화 측정기기를 홍보 온라인 촉진: 글로벌 Search를 위해 구글에 키워드 검색 광고 등록을 함으로써 해외 시장에 접근함.

○ 마케팅적 활용 계획 및 판로 개척

- 초기 시장 접근전략

- 초기에는 특정 래피드킷에 특화된 플랫폼 도입 및 판매계획 수립함.
- 수행 전담 인력 확보를 통한 사업 준비 초기 마케팅 진행
- 해외 전시회, 바이어 미팅 등 다양한 마케팅 활동을 통한 제품 홍보.
- 특히 래피드킷 제조업체의 해외시장 진출 가속화 발맞춰 래피드킷 업체와 전략적 제휴를 통한 글로벌 시장 진출 계획 수립 및 진출

- 사업 성숙 단계 접근 전략

- 글로벌 서비스 운영 및 확장을 위한 개발 인력 충원 및 영업/마케팅 확대를

위한 인력 확충

- 기 개발에 대한 안정성 확보를 위한 글로벌 플랫폼 연계 및 확장
  - 센서 디바이스를 응용 확대 적용하여 추가적인 래피드킷 생산업체에 대한 매칭 확장
- 제품 활용한 매출 증가 계획 [실시계획]
- 시제품 validation 테스트 및 국내 딜러를 통한 제품출시
  - 약 1년 간 국내고객의 feedback을 해외 출시 제품에 반영
  - 최종 해외 판매용으로 완성된 제품을 글로벌 해외 딜러 네트워크를 통하여 판매

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

연구목표	연구기관	연차별 세부연구목표
화학발광 기반 조류 인플루엔자 진단 기술 개발	충남대 수의과대학 (주관기관)	<p>&lt; 1차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발</li> <li>○ 반응조건 최적화</li> <li>○ 현장용 검출키트 제작</li> <li>○ 현장용 검출기의 측정 감도 및 한계 검사</li> </ul>
		<p>&lt; 2차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고병원성 인플루엔자 감별진단용 test kit 제작</li> <li>○ 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작</li> <li>○ 슈도바이러스를 이용한 감별진단기술 검증</li> <li>○ 기타 조류바이러스와의 감별진단기술 검증</li> </ul>
화학발광 기반 조류 인플루엔자 진단을 위한 시료진처리 기술 개발	충남대 동물의과학연구소 (세부기관)	<p>&lt; 1차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감염시료 제작</li> <li>○ 감염시료를 이용한 진단기술 검증</li> <li>○ 동물시료 내 유효 오염물 탐색</li> <li>○ 감염시료 전처리 기술 개발</li> </ul>
		<p>&lt; 2차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 임상시료 확보</li> <li>○ 시제품 성능 검사</li> <li>○ 정량화 프로그램 검증</li> </ul>
화학발광 기반 조류 인플루엔자 신속 진단키트 제작	(주) 씨맥 (협동기관)	<p>&lt; 1차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 광학 모듈 개발</li> <li>○ 하드웨어 개발</li> <li>○ 펌웨어 / Touch panel LCD 개발</li> <li>○ 성능평가</li> </ul>
		<p>&lt; 2차년도 &gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시제품 제작</li> <li>○ 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작</li> <li>○ 경제성 분석 및 판로확보</li> </ul>

### 3-2. 목표 달성여부

연구목표	연구기관	연차별 세부연구목표	달성도 (%)
화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술 개발	충남대 수의과대학 (주관기관)	< 1차년도 > ○ 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발 ○ 반응조건 최적화 ○ 현장용 검출키트 제작 ○ 현장용 검출기의 측정 감도 및 한계 검사	100%
		< 2차년도 > ○ 고병원성 인플루엔자 감별진단용 test kit 제작 ○ 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작 ○ 슈도바이러스를 이용한 감별진단기술 검증 ○ 기타 조류바이러스와의 감별진단기술 검증	100%
화학발광 기반 조류인플루엔자 진단을 위한 시료전처리 기술 개발	충남대 동물의학연구원 소 (세부기관)	< 1차년도 > ○ 감염시료 제작 ○ 감염시료를 이용한 진단기술 검증 ○ 동물시료 내 유효 오염물 탐색 ○ 감염시료 전처리 기술 개발	100%
		< 2차년도 > ○ 임상시료 확보 ○ 시제품 성능 검사 ○ 정량화 프로그램 검증	100%
화학발광 기반 조류인플루엔자 신속진단키트 제작	(주) 씨맥 (협동기관)	< 1차년도 > ○ 광학 모듈 개발 ○ 하드웨어 개발 ○ 펌웨어 / Touch panel LCD 개발 ○ 성능평가	100%
		< 2차년도 > ○ 시제품 제작 ○ 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작 ○ 경제성 분석 및 판로확보	100%

### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 민감도 개선
  - 고민감도를 가지는 신규 리포터 (nano-luc 등) 시스템 구축을 통한 진단기술 고도화
  - PMT sensor를 이용한 현장용 화학발광검출기 개발
  - 다양한 농도의 바이러스를 포함하는 실험용 및 현장시료를 이용한 민감도 검증
  
- 특이도 개선
  - Nanoparticle과 인플루엔자바이러스 사이의 특이도 분석
  - 5종 이상의 조류인플루엔자 바이러스를 이용한 특이도 검증
  - 다른 조류 바이러스 및 동물 바이러스를 이용한 특이도 검증
  
- 기존 진단법과의 비교평가를 통한 기술의 우수성 검증
  - 간이진단키트와의 민감도 및 특이도 비교 분석
  - ELISA 시험법과의 민감도 및 특이도 비교 분석
  - PCR 시험법과의 민감도 및 특이도 비교 분석
  
- 전처리 시료의 다양성 확보
  - 분변시료를 이용한 시료전처리 기술 확립
  - 혈청 시료를 이용한 시료전처리 기술 확립
  - Nasal swab 시료를 이용한 시료전처리 기술 확립

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- **현장용 조류인플루엔자 진단 분야:** 매년 겨울철에 양계농장에서 발생하는 조류인플루엔자 바이러스를 신속하고 정확하게 진단하여 질병의 확산을 최소화함으로써 조류인플루엔자바이러스에 대한 국가 방역체계를 확립함.
- **고병원성 조류인플루엔자 감별진단 및 확산 방지에 활용:** 현장에서 고병원성 조류인플루엔자를 진단함으로써 신속하게 질병의 확산을 방지하여 가금류의 살처분 등에 소요되는 직접적·간접적인 경제적 피해를 최소화하고 인수공통전염병의 확산을 방지함.
- **정량적 조류인플루엔자 진단:** 현재까지 개발된 진단기기는 정성적 또는 반정량적인 측정만이 가능하여 음성과 양성 판정만 이루어졌음. 본 연구과제를 통해 개발되는 진단기술에서 사용되는 화학발광은 발색 및 형광에 비해 정량적인 측정이 매우 탁월하다는 장점을 가지고 있으며 실험실내 연구로 수립된 정량그래프와 접목하여 정량적 진단결과를 생산해 낼 수 있음. 이는 추가적으로 요구되는 정밀진단의 필요성을 제거함으로써 신속한 방역 및 진단비용의 감소에 이바지할 수 있음.
- **가금류 및 철새군집 내 조류인플루엔자 역학검사 분야:** 양계농가 뿐 아니라 야외의 철새 등에 분포되어 있는 조류인플루엔자의 확산 정도를 검사함으로써 역학 정보를 수집하여 철새를 통한 조류인플루엔자 전파를 최소화함.
- **인체 및 돼지 인플루엔자 진단 분야:** 본 연구과제를 통해 개발되는 진단기술은 항체를 이용한 방법이 아니며, 인플루엔자바이러스가 가지는 감염상의 특성을 이용한 것으로 혈청형에 관계없이 적용이 가능함. 인체 및 돼지에 감염하는 인플루엔자는 혈청형은 다르지만 조류인플루엔자와 동일한 기전에 의해 세포에 감염을 일으키므로 본 검출기기를 공통적으로 이용이 가능함.
- **다른 동물질병 진단 분야:** 본 연구기술은 협막을 가지는 바이러스의 감염시 발생하는 현상을 이용한 것으로 반응물질의 표면에 발현하는 세포수용체의 변경만으로 새로운 동물질병 진단에 이용이 가능함.
- **화학발광 기반 POCT 진단 분야:** 화학발광을 기반으로한 POCT 진단분야는 아직 개척되지 않은 신기술로 고감도, 정량적, 저비용이라는 특징을 가지고 있으며 동물진단시장을 포함하여 다양한 체외진단시장에 적용이 가능함.

## 4-2. 기대성과 및 파급효과

### <기대성과>

- 연구결과에 따른 저비용, 고감도, 고특이성의 조류인플루엔자바이러스 진단 기술을 기반으로 한 상품화로 국내외의 동물질병진단시장에 경쟁력 확보 전망됨.
- 실시간 초고감도 특성과 더불어 소형화 및 저가화를 이루어 현장진단 (POCT; point of care test)의 신시장 개척이 기대됨.

### <파급효과>

#### ○ 기술적 측면

- 높은 민감도와 특이도를 가지면서도 저비용으로 이용이 가능한 화학발광기법을 진단키트 시장에 도입함으로써 발광기법 및 형광기법을 넘어서 기술적 진보를 이룰 수 있음.
- 현장형 화학발광 검출기의 개발로 화학발광기반의 진단기술을 현장용 검사키트 개발에 이용할 수 있음.
- 아직 특허등록이 이루어지지 않은 신기술로 특허 창출 및 기술이전 등 지식재산권 확보가 용이할 것으로 생각됨.
- 현재 유사한 기술로 상용화된 제품이 확인되지 않으므로 시장 진입시 시장선점 효과가 클 것으로 예상됨.

#### ○ 경제적·산업적 측면

- 조류인플루엔자 특히 고병원성인플루엔자의 발생을 현장에서 신속하고 정확하게 진단함으로써 질병의 확산을 최소화하므로 양계농가의 경제적 안정을 줄 수 있으며, 고병원성 조류인플루엔자 방역에 사용하던 국비를 절약하는 효과가 있음.
- 조류인플루엔자 진단키트의 실용화로 국내 동물용 진단업계의 활성화, 국제 경쟁력 강화 및 수출 기반 확충에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

#### ○ 사회적 측면

- 조류인플루엔자 특히 고병원성 조류인플루엔자의 신속한 진단법 확보로 국민의 삶의 안정을 추구할 수 있으며 국가 경쟁력이 강화됨.

붙임. 참고문헌



<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발				
	(영문) Development of rapid diagnosis kit for avian influenza virus using chemiluminescence				
주 관 연구 기관	충남대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 충남대학교 수의과대학	
참 여 기 업	(주)씨맥			(성명) 박 정 은	
총 연구개발비 (600,000천원)	계	600,000천원	총 연 구 기 간	2019. 05. 27 - 2020. 12. 31 (20개월)	
	정부출연 연구개발비	450,000천원		총 참 연 구 원 수	총 인 원
	기업부담금	150,000천원	내부인원		18명
	연구기관부담금		외부인원		
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>○ 본 연구의 최종 목적은 고감도, 고특이성 (고병원성과 저병원성 감별), 정량화를 특징으로 하는 화학발광법을 기반으로 한 현장용 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트를 개발하는 것임.</p> <p>○ 이를 위해 아래의 세부목표를 중심으로 연구를 수행함.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 개발 및 최적화,</li> <li>2) 조류인플루엔자바이러스 실시간진단을 위한 시료 전처리기술 개발,</li> <li>3) 화학발광법 기반 조류인플루엔자바이러스 진단기기 및 IoT 프로그램 개발</li> </ol> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발</li> <li>- Intervirion fusion assay 반응조건 최적화</li> <li>- 현장용 검출키트 제작</li> <li>- 현장용 검출키트 측정감도 및 한계 검사</li> <li>- 고병원성 인플루엔자 감별진단용 키트 제작</li> <li>- 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 슈도바이러스 제작</li> <li>- 슈도바이러스를 이용한 감별진단 기술 검증</li> <li>- 기타 조류바이러스 및 분변샘플을 이용한 감별진단기술 검증</li> <li>- <u>관련 연구 성과</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 특허 출원 : 화학 발광 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2020-0182437, 출원일자:2020.12.23.), 화학 발광 기반의 코로나 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2021-0021142, 출원일자: 2021.02.17.)</li> <li>2) 논문 투고 : Differential diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus using nanoparticles expressing chemiluminescence</li> </ol> </li> </ul> </li> </ol>					

3) 학술대회 발표 : 4건

2. 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단을 위한 시료전처리 기술 개발

- 감염시료 제작
- 감염시료를 이용한 진단기술 검증
- 동물시료 내 유효 오염물 탐색
- 감염시료 전처리 기술 개발
- 임상시료 확보
- 시제품 성능 검사
- 정량화 프로그램 검증
- 관련 연구 성과

1) 인력양성 : 석사과정 2명

3. 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 제작

- 화학발광 진단기기 광학모듈 개발
- 화학발광 진단기기 하드웨어 개발
- 화학발광 진단기기 펌웨어/Touch panel LCD 개발
- 시제품 제작 및 성능평가
- 정량화 및 IoT 구현을 위한 펌웨어 제작
- 경제성 분석 및 판로확보
- 관련 연구 성과

1) 사업화 : 화학발광 기반 조류인플루엔자바이러스 진단용 시제품 2건

2) 고용창출 : 8명

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 현장용 조류인플루엔자 확정 진단 가능: 매년 겨울철에 양계농장에서 발생하는 조류인플루엔자바이러스를 신속하고 정확하게 진단하여 질병의 확산을 최소화함으로써 조류인플루엔자바이러스에 대한 국가 방역체계를 확립함.
- 농가에서의 고병원성 조류인플루엔자 감별진단 및 확산 방지에 활용 가능: 현장에서 고병원성 조류인플루엔자를 진단함으로써 신속하게 질병의 확산을 방지하여 가금류의 살처분 등에 소요되는 직접적·간접적인 경제적 피해를 최소화하고 인수공통전염병의 확산을 방지함.
- 정량적 조류인플루엔자바이러스 진단법: 현재까지 개발된 현장용 진단기기는 정성적 또는 반정량적인 측정만이 가능하여 음성과 양성 판정만 이루어졌음. 본 연구과제를 통해 개발되는 진단기술에서 사용되는 화학발광은 발색 및 형광에 비해 정량적인 측정이 매우 탁월하다는 장점을 가지고 있으며 실험실내 연구로 수립된 정량그래프와 접목하여 정량적 진단결과를 생산해 낼 수 있음. 이는 추가적으로 요구되는 정밀진단의 필요성을 제거함으로써 신속한 방역 및 진단비용의 감소에 이바지할 수 있음.
- 다른 동물질병 진단 분야: 본 연구기술은 협막을 가지는 바이러스의 감염시 발생하는 현상을 이용한 것으로 반응물질의 표면에 발현하는 세포수용체의 변경만으로 새로운 동물질병 진단에 이용이 가능함. 동일한 원리로 코로나바이러스 진단시스템을 구축하기 위한 추가연구를 진행 중임.
- 화학발광 기반 POCT 진단 분야: 화학발광을 기반으로 한 POCT 진단분야는 아직 개척되지 않은 신기술로 고감도, 정량적, 저비용이라는 특징을 가지고 있으며 동물진단시장을 포함하여 다양한 체외진단시장에 적용이 가능함.

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	119057-02		
사업구분					
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관 (✓)
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발			과제유형	개발
연구기관	충남대학교 산학협력단			연구책임자	박정은
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019.05-2019.12	180,000	60,000	240,000
	2차연도	2020.01-2020.12	270,000	90,000	360,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2019.05-2121.12	450,000	150,000	600,000
참여기업	(주)씨맥				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.01.29

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충남대학교	조교수	박정은

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	---

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 고병원성 조류 인플루엔자바이러스를 신속 진단할 수 있는 신규 기전 기반의 진단기술을 개발함.
- 기존에 이용되던 발색 및 형광기반이 아닌 화학발광기반의 현장용 검출기를 개발함.
- 특허 출원 2건, 사업화 2건, 매출창출, 고용 창출 등 사업화 성과의 달성이 우수함.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

- 조류인플루엔자 특히 고병원성 인플루엔자의 발생을 현장에서 신속하고 정확하게 진단함으로써 질병의 확산을 최소화하므로 양계농가의 경제적 안정을 줄 수 있으며, 방역에 사용하던 국비를 절약하는 효과가 있음.
- 조류인플루엔자 진단키트의 실용화로 국내 동물용 진단업계의 활성화, 국제 경쟁력 강화 및 수출 기반 확충에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

- 현장에서 고병원성 조류인플루엔자를 진단함으로써 신속하게 질병의 확산을 방지하여 가금류의 살처분 등에 드는 직접적·간접적인 경제적 피해를 최소화하고 인수공통전염병의 확산을 방지함.
- 화학발광을 기반으로 한 POCT 진단 분야는 아직 개척되지 않은 신기술로 고감도, 정량적, 저비용이라는 특징을 가지고 있으며 동물진단시장을 포함하여 다양한 체외진단시장에 적용이 가능함.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

- 연구제안서에 기술한 연구목표 및 연구내용을 100% 달성하였음.
- 계획서 제출시 제안한 연구성과를 100% 달성하지는 못하였으나, 사업화, 매출 및 고용 창출 등 사업화 성과를 추가적으로 달성하였음.
- 본 연구를 바탕으로 코로나바이러스 진단기술 개발에 관한 연구를 추가적으로 수행하여 특허 출원함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 특허출원 : 화학 발광 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도 (출원번호: 10-2020-0182437, 출원일자:2020.12.23.) 외 1건
- 학술대회 발표 : 4건
- 사업화 : 1건
- 고용창출 : 8건
- 인력양성 : 2건

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술 개발	40	100	- 조류 인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발 및 최적화 - 현장용 검출키트 제작 및 측정감도, 한계 검사 - 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 감별진단용 진단기술 개발 - 슈도바이러스를 이용한 감별진단용 진단기술 검증 - 3중 혈청형의 인플루엔자 바이러스 및 기타 조류 바이러스를 이용한 진단기술 검증
화학발광 기반 조류인플루엔자 진단을 위한 시료전처리 기술 개발	30	100	- 감염시료 및 임상시료 제작 - 동물시료 내 유효 오염물 탐색 - 감염시료 전처리 기술 개발
화학발광 기반 조류인플루엔자 신속진단키트 제작	30	100	- 조류 인플루엔자 진단용 화학발광 검출기(시제품) 2건 제작 - 돼지 바이러스 진단용 화학발광 검출기 1건 제작 및 매출 창출 - 정량화를 위한 펌웨어 제작 - 경제성 분석 및 판로 확보
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- **우수성:** 고병원성 조류 인플루엔자바이러스를 신속 진단할 수 있는 신규 기전 기반의 진단기술과 현장 진단을 위한 화학발광 검출기를 개발함.
- **달성도:** 연구제안서에 기술한 연구목표 및 연구내용을 100% 달성함.
- **연구성과:** 특허출원 2건, 학술대회 발표 4건, 사업화 2건, 고용창출 8건, 인력양성 2건 달성
- **활용방안 및 파급효과:** 현장에서 고병원성 조류인플루엔자를 진단함으로써 신속하게 질병의 확산을 방지하여 가금류의 살처분 등에 드는 직접적·간접적인 경제적 피해를 최소화하고 인수공통전염병의 확산을 방지함.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 연구제안서에 기술한 연구목표 및 연구내용을 100% 달성함.
- 계획서 제출시 제안한 연구성과를 100% 달성하지는 못하였으나, 사업화 및 고용 창출 등 사업화 성과를 추가적으로 달성하였음.
- 본 연구를 바탕으로 코로나바이러스 진단기술 개발에 관한 연구를 추가적으로 수행하여 특허 출원함.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 높은 민감도와 특이도를 가지면서도 저비용으로 이용이 가능한 화학발광기법을 진단키트 시장에 도입함으로써 발광기법 및 형광기법을 넘어서 기술적 진보를 이룰 수 있음.
- 현장형 화학발광 검출기의 개발로 화학발광기반의 진단기술을 현장용 검사키트 개발에 이용할 수 있음.
- 현재 유사한 기술로 상용화된 제품이 확인되지 않으므로 시장 진입시 시장선점 효과가 클 것으로 예상됨.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	가축질병대응기술개발사업	
연구과제명	화학발광을 이용한 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트 개발			
주관연구기관	충남대학교 산학협력단		주관연구책임자	박 정 은
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000천원	150,000천원		600,000천원
연구개발기간	2019.05.27. - 2020.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류 인플루엔자바이러스 진단을 위한 intervirion fusion assay 개발 및 최적화</li> <li>- 현장용 검출키트 제작 및 측정감도, 한계 검사</li> <li>- 고병원성 및 저병원성 인플루엔자 감별진단용 진단기술 개발</li> <li>- 슈도바이러스를 이용한 감별진단용 진단기술 검증</li> <li>- 2중 혈청형의 인플루엔자 바이러스 및 기타 조류 바이러스를 이용한 진단기술 검증</li> </ul>
② 화학발광 기반 조류인플루엔자 진단을 위한 시료전처리 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 감염시료 및 임상시료 제작</li> <li>- 동물시료 내 유효 오염물 탐색</li> <li>- 감염시료 전처리 기술 개발</li> </ul>
③ 화학발광 기반 조류인플루엔자 신속진단키트 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 조류 인플루엔자 진단용 화학발광 검출기(시제품) 2건 제작</li> <li>- 정량화를 위한 펌웨어 제작</li> <li>- 경제성 분석 및 판로 확보</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능



### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	30	30											10	10		10				
최종목표	4	2		1	20	1	50				4		5	4		4	1			
연구기간내 달성실적	2	0				1			8					4		2	0			
달성율(%)	50	0				10 0								10 0		50	0			

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	화학발광 기반 조류인플루엔자 진단기술
②	화학발광 검출을 위한 시료 전처리 기술
③	현장용 화학발광 검출기 개발 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

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

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기술이전 및 사업화
②의 기술	사업화
③의 기술	사업화

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보진시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	30	30											10	10		10	10		
최종목표	4	2		1	20	1	50					4		4		4	1		
연구기간내 달성실적	2	0		0		1			8			0		5	4		2	0	
연구종료후 성과창출 계획	2	2		1	20		50					4		5			2		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

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

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전시 선행조건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

#### 주 의

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