

RS-  
2022-IP  
322085

음극  
전기화학  
발광법  
및  
측면유동  
분석을  
이용한  
SFTS  
신속진단  
키트  
개발

2024

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

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

발간등록번호

11-1543000-004583-01

# 음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속진단 키트 개발

2024.06.05.

주관연구기관 / (주)바이오메트로  
공동연구기관 / (주)움틀

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

최종보고서										보안등급 일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			반려동물전주기 산업화기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		반려동물 맞춤형 의약 품 및 서비스 개발					
공고번호		제 농축 2022-19호			총괄연구개발 식별번호							
					연구개발과제번호		322085-02					
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0701	40%	2순위 LA0702	30%	3순위 LC0499	30%					
	농림식품과학기술분류	1순위 RB0202	50%	2순위 RB0201	30%	3순위 RB0299	20%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문	음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속진단 키트 개발									
		영문	Development of SFTS rapid diagnostic kit using cathodic electrochemiluminescence and lateral flow assay									
주관연구개발기관		기관명		주소		사업자등록번호		법인등록번호				
		(주)바이오메트로		(08380)서울시 구로구 디지털로 33길 11, 205		737-86-00203		110111-5868348				
연구책임자		성명	오 천 택			직위	대표이사					
		연락처	직장전화					휴대전화				
			전자우편					국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2022. 04. 01. - 2023. 12. 31.(21개월)								
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2022. 04. 01. - 2022. 12. 31.(9개월)								
				2023. 01. 01. - 2023. 12. 31.(12개월)								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		1,166,000	22,240	325,160	0	0	0	0	1,188,240	325,160	1,513,400	
1단계		1년차	500,000	0	125,000	0	0	0	500,000	125,000	625,000	
		2년차	666,000	22,240	200,160	0	0	0	688,240	200,160	888,400	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고				
		(주)옴틀	박성률		대표 이사			공동연 구	중소기업			
		조선대학교 산학협력단	김동민		교수			위탁연 구	대학			
연구개발담당자 실무담당자		성명	김 대 수			직위	선임연구원					
		연락처	직장전화					휴대전화				
			전자우편					국가연구자번호				

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

2024 년 2 월 15 일

연구책임자: 오 천 택 (인)

주관연구개발기관의 장: 오 천 택 (직인)

공동연구개발기관의 장: 박 성 률 (직인)

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

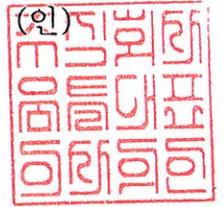
본 보고서를 “음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속진단  
키트 개발”(개발기간 : 2022.04. ~ 2023.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 05.

주관연구기관명 : (주)바이오메트로 (대표자) 오 천 택



공동연구기관명 : (주)움틀 (대표자) 박 성 룰



주관연구책임자 : 오 천 택

공동연구책임자 : 박 성 룰

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	반려동물전주기산업화학기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
내역사업명 (해당 시 작성)	반려동물 맞춤형 의약품 및 서비스 개발			연구개발과제번호		322085-02	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0701	40%	2순위 LA0702	30%	3순위 LC0499	30%
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB0202	50%	2순위 RB0201	30%	3순위 RB0299	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제명	음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속진단 키트 개발						
전체 연구개발기간	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31 ( 1 년 9 개월)						
총 연구개발비	총 1,513,400 천원 (정부지원연구개발비: 1,166,000 천원, 기관부담연구개발비: 347,400 천원, 지방자치단체: 0 천원, 그 외 지원금: 0 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준 ( 5 ) 종료시점 목표( 8 )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	-						
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<p>(1) 가정용 신속 진단키트(LFA) 개발 및 병원용 C-ECL 기술을 적용한 현장 진단 기기 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신속 진단키트(LFA)와 혁신적인 원천 기술인 C-ECL을 이용하여 민감도 90% 이상, 특이도 98% 이상, 오차범위 5% 이하의 정밀도를 갖는 소형의 전용 장비 개발 및 시제품 제작</li> <li>○ 재조합 단백질을 항원으로 ELISA를 수행하여 LFA, C-ECL 진단기기의 성능을 교차 평가</li> </ul> <p>(2) 가정용 신속 진단키트(LFA)용 핵심 요소 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신속 진단키트용 NC 멤브레인 개발 및 중소 중소기업 R&amp;D 네트워킹을 통한 NC 멤브레인의 부자재 기술 개발</li> </ul> <p>(3) SFTS 진단을 위한 항원 물질 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 SFTS 단백질의 항원 결정기 분석을 통해 바이러스 감염기전 또는 항체 생성과 관련된 SFTS 바이러스 항원 후보물질 확보하고, SFTS NP 재조합단백질에 대한 다클론 항체 확보</li> </ul>				
	전체 내용		<p>(1) 1차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ SFTS 진단을 위한 항원을 본 연구기관의 혁신 기술인 C-ECL 시스템에 적용하여 항체 진단 키트 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ SFTS 항체 진단 바이오마커 감도 테스트</li> <li>▶ 검출 항체/항원 안정성 테스트 및 보완</li> <li>▶ 항체/항원 고정화 조건 최적화</li> </ul> </li> </ul>				

		<p>○ (참여:웁틀) 신속진단키트의 원부자재 중 니트로셀룰로스 (Nitrocellulose) 전개형 멤브레인의 롤투롤(roll-to-roll) 대량 생산을 공정 설계 및 테스트</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 진단키트 원부자재의 해외의존도가 높은, LFA (lateral flow assay) 연구개발 및 국산화 기술개발, 패드 3종, 멤브레인 1종의 국산화 및 항원/항체 코팅기술의 활용을 통해 진단키트 원부자재 기술 확보</li> </ul> <p>○ (위탁:조선대) SFTS 진단용 항원, 항체의 개발 및 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ SFTS 단백질의 항원 결정기 분석, SFTS 바이러스 항원 후보 물질 확보 및 SFTS NP 재조합단백질에 대한 다클론 항체 확보</li> </ul> <p>(2) 2차년도</p> <p>○ LFA, C-ECL 시스템에 적용하여 항체진단 키트 시제품 제작, 임상 및 품목허가 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ SFTS 카트리지 및 전용 장비 목업 준비</li> <li>▶ 카트리지 안정성 및 성능 테스트</li> <li>▶ 임상평가 승인 및 품목허가 신청</li> </ul> <p>○ (참여:웁틀) SFTS 진단키트 원료인 NC멤브레인의 생산과 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 파일럿 규모의 NC멤브레인 생산시설에서 최종 제품화를 진행</li> </ul> <p>○ (위탁:조선대) SFTS 바이러스 배양법 세팅 및 항원, 항체를 이용한 LFA, C-ECL 항체진단키트 성능평가 셋팅 및 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 전북대학교 수의병원으로부터 동물의 혈청을 공급받아 연구에 활용</li> <li>▶ SFTS NP 재조합 단백질을 항원으로 SFTS 감염동물의 혈청과 건강한 동물 혈청을 이용하여 Indirect ELISA를 수행함</li> </ul>				
	1단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="630 1592 821 1630">목표</td> <td data-bbox="821 1592 1428 1630"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="630 1630 821 1671">내용</td> <td data-bbox="821 1630 1428 1671"></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						
	n단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="630 1671 821 1709">목표</td> <td data-bbox="821 1671 1428 1709"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="630 1709 821 1756">내용</td> <td data-bbox="821 1709 1428 1756"></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						

연구개발성과	<p>○ LFA용 카트리지 구조 최적화 - 전용 카트리지 설계 및 금형 제작</p> <p>○ C-ECL 진단기기 성능개선 (SiPM) - SiPM 모듈 제작 및 냉각소자(펠티어)를 적용한 dark noise 개선, SiPM 모듈 진공 유지를 위한 하우징 구조 설계 변경, 광학구조 개선을 통한 성능 향상, 실용성과 사용자 편의성이 강조된 진단기기 디자인 설계 변경, GUI(Graphic User Interface) 구성</p> <p>○ C-ECL 진단기기 항원/항체 안정화 테스트 - 항원/항체 안정화를 위한 Blocking Buffer 조건 최적화</p> <p>○ C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화 - 고정 버퍼 변경 테스트</p>
--------	--

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용 - Ruthenium 가능성 확인</li> <li>○ 민감도 특이도 평가 - 현재 항원 조합에서 중농도 표준물질의 검출까지 가능함을 확인</li> <li>○ 장기 보관 안정성 평가 - 가속노화 테스트로 상온에서 약 3개월 안정성 확보</li> <li>○ 물리 화학적 밸리데이션 수행 - 최적 pH 조건 확보</li> <li>○ 시제품 제작 - 기초 테스트를 위한 임시 시제품 2종 제작</li>   <li>○ 실검체 표준물질 제작 - 수집된 동물 실검체를 이용하여 표준물질 제작</li> <li>○ NC 멤브레인 동등성 테스트 (LFA) - 공동연구기관인 움틀에서 제조한 멤브레인이 기성품과 동등한 성능을 보임</li> <li>○ 최적화 테스트 (LFA) - 항원/항체 농도 및 blocker를 조절하여 최적화</li> <li>○ 검체 점적 방법 및 채취 도구 테스트 (LFA)</li> <li>○ 포장 박스 제작 (LFA) - 표시기재 사항에 맞추어 제작</li> <li>○ 분석적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA) - 최소검출한계, 교차반응, 간섭반응, 반복성, 재현성, 사용기한 설정</li> <li>○ 임상적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA) - 양성 10개, 음성 20개 검체로 자체 임상 평가 수행</li> <li>○ 실검체 표준물질 C-ECL 테스트</li> <li>○ C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화</li> <li>○ 음성 실검체 비특이 반응 확인 (C-ECL)</li> <li>○ 분석적 성능평가 (C-ECL) - 최소검출한계, 교차반응, 간섭반응, 반복성, 재현성, 사용기한 설정</li> <li>○ 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용 - 최적 발광물질 선정 및 최적화 테스트</li> <li>○ 카트리지 및 전용 장비 목업 준비 - 카트리지 구조 최적화 및 기기 호환 테스트</li> <li>○ 카트리지 안정성 테스트 - 정밀성 테스트 및 보완</li> <li>○ SiPM ECL Analyzer 시제품 설계 및 제작</li>   <li>○ NC (nitrocellulose) 멤브레인의 백킹(backing)기술 개발</li> <li>○ LFA용 NC 멤브레인 상용화, 대량생산 기술 개발</li>   <li>○ NC 멤브레인 품질 향상을 위한 배합 조건 최적화 진행</li> <li>○ DAF110 제품의 품질 개선을 통한 신속 진단키트 적용</li> <li>○ ISO13485 품질경영 인증 획득</li>   <li>○ SFTS 바이러스 항원 후보물질 확보</li> <li>○ SFTS NP 재조합 단백질에 대한 다클론 항체 확보 및 정제</li>   <li>○ SFTS 바이러스 배양법 구축</li> <li>○ 세포감염 확인을 위한 IFA 슬라이드 확인</li> <li>○ 식물 SFTS NP 재조합 단백질의 순도 개선 및 대량 정제</li> <li>○ SFTS 바이러스 동물 감염 항체 진단용 ELISA setting</li> </ul>
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SFTS 바이러스에 대한 항바이러스제와 백신이 상용화되어 있지 않은 상황에서, 현장에서의 SFTS에 대한 정확하고 빠른 조기 진단기술이 매우 절실함</li> <li>○ 본 연구에서 개발하는 C-ECL 플랫폼 및 측면유동분석 기반 진단 키트는 소형이고 신속하며 사용자 친화적이며 때문에 현장 및 가정(Home-care)에 보급되어 활용 가능함</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 따라서 주요 수요처는 진단 연구실 및 수의 병원뿐만 아니라 일반 가정에도 보급되어 반려동물 진단에 활용 가능할 것으로 기대됨</li> <li>○ 독점적 기술경쟁력을 바탕으로 글로벌 시장 수출 발생 및 수입대체 효과가 발생할 것으로 예상됨</li> <li>○ 진단연구실, 수의병원, 연구기관, 개인(Home-care) 등 최종 수요처의 총 시장 규모는 2025년에 약 30억 달러 규모로 예상되며, 본 연구에서 개발되는 키트로 글로벌 시장 진출 시 선도 제품으로써 시장을 주도할 것으로 예상됨</li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
		4					1	생명 정보	생물 자원		정보	실물	
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	음극전기화학발광법		측면유동분석		인수공통감염병		중증열성혈소판 감소증후군		현장진단				
영문핵심어 (5개 이내)	C-ECL		LFA		Zoonosis		SFTS		Point-of-care testing				

## < 목 차 >

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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

## 1. 연구개발과제의 개요

- 중증열성혈소판감소증후군(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS)은 사람이나 동물이 SFTS 바이러스 감염에 의한 열성 출혈성 질병으로 2007년 이래 고열, 백혈구 감소, 혈소판감소, 소화기증상(오심, 구토, 설사 등)의 임상 증상을 나타내는 원인 불명의 환자가 중국 중부(허난성, 후베이성, 안후이성) 농촌(산간)지역에서 다수 발생함을 시작으로 한국과 일본에서 환자 발생이 보고<sup>1)</sup>되어 현재까지 한, 중, 일 3국을 중심으로 발생
- 국내 2013년 첫 보고 이후 매년 환자 및 사망자 발생이 지속적으로 증가되고 있음. 그러나 전세계적으로 아직까지 SFTS 바이러스를 치료할 수 있는 확실한 치료제가 없고, 불활성화한 SFTS 바이러스를 이용한 백신이나, DNA 백신, 약독화 백신 등의 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있으나 유효한 예방백신이 없는 실정임

\* (2019 기준) 환자 223명, 사망자 41명 발생(치사율 18.4%)

- SFTS는 고열, 구토, 설사, 혈소판감소, 백혈구감소 및 다발성 장기부전과 같은 증상을 동반하며, 치사율이 6-30%에 이르는 심각한 질환<sup>2)</sup>이며 한국 질병관리청은 2015년에 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스에 감염된 환자를 돌보던 대학병원의 의사와 간호사들이 이 바이러스에 2차 감염된 것을 보고함. 최초 감염자가 진단된 2013년부터 2015년 7월까지 한국 내에서 집계된 SFTS 확진환자는 총 122명이었으며 이 중 40명이 사망한 것으로 알려지고 있음
- 반려동물 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염에 의한 인체감염을 예방하고 **임상 현장에서 신속하고 체계적인 대응을 위해 SFTS 항체(IgM/IgG) 감별 신속 진단 토탈 솔루션을 제공하고자 함**
  - ▶ 민감도(90%) 특이도(98%) 이상을 위한 NC 멤브레인 및 강소 중소기업 R&D 네트워킹을 통한 **NC멤브레인, 러닝버퍼, 항원/항체 등의 진단키트의 핵심 요소기술의 국산화 및 신속 진단키트(Lateral flow assembly, LFA)을 개발**
  - ▶ **C-ECL을 이용하여 진단 시간을 줄이고 정밀도 높은 소형의 전용 장비 개발을 상용화**하여 신속하고 정확하게 진단하고 다양한 변이에 대응할 수 있는 서열의 SFTS에 대한 효과적인 진단이 필요함

### 1-1. 연구 개발 대상의 국내외 현황

#### 1) SFTS 바이러스 관련 국내·외 기술 현황

- **현행 SFTS 바이러스의 진단법 개발현황**
  - ▶ RT-PCR 혹은 real-time RT-PCR 등의 방법을 이용하여 바이러스 RNA를 검출하여 진단하는 방법이 이용되고 있음
  - ▶ ELISA assay (indirect ELISA, double antigen sandwich ELISA) 와 Indirect immunofluorescence 등의 혈청학적 진단 방법도 이용 가능함
- **현행 SFTS 바이러스의 치료현황**
  - ▶ 아직까지는 SFTS 바이러스를 치료할 수 있는 확실한 치료제나 백신은 없음
  - ▶ 전 세계적으로 항바이러스제 개발을 시도하고 있지만 아직 in vitro 수준에 머물러 있음  
(가) Ribavirin 투여
    - 항바이러스제로 ribavirin을 투여해 볼 수는 있지만 항바이러스제로 ribavirin 정주를 시도

1) Takahashi et al. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome in Japan, The Journal of Infectious Diseases, Volume 209, Issue 6, 15 March 2014, Pages 816 - 827

2) Yu XJ et al., N. Engl. J. Med. 2011; 364:1523-32; Ding F et al Clin Infect Dis 2013; 56: 1682-3).

했던 연구에서 투여된 군이나 투여되지 않은 군 사이에 치사율의 차이는 관찰되지 않음<sup>3)</sup>

- Ribavirin 투여는 빈혈과 혈중 아밀라아제 상승과 같은 부작용을 증가시키는 것으로 나타남<sup>4)</sup>

#### (나) 혈장교환술 (Plasmapheresis)

- SFTS 환자에서 IL-1 $\beta$ , IL-8, macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 과 같은 사이토카인 (cytokine)들은 질병의 진행과 증증에 관련된 것으로 알려짐. 사이토카인의 제거를 위해서 이론적으로 혈장교환술(plasma exchange)을 시도가능
- 혈장교환과 ribavirin 경구투여를 통해서 치료된 증례가 보고되었으며<sup>5)</sup> 다기관 후향적 연구에서 혈장 교환술군과 대조군에서 30일 생존률에는 차이가 없었으나 초기에 혈장 교환술을 시행 받은 군에서 생존율에 도움을 줄 수 있음을 보고함 그러나 효과적인 치료법으로 검증되지 못함

#### (다) 면역글로블린 (immunoglobulin)

- 면역글로블린은 보체(complement) 활성화, 바이러스 중화(neutralization), 항체 의존성 세포매개 세포독작용 (antibody dependent cellular cytotoxicity), 그리고 옵소닌 작용 (opsonization)을 통해서 다양한 바이러스 질환의 치료에 중요한 역할을 함
- 국내에서 면역글로블린과 스테로이드를 병합하여 치료한 증례가 보고된 바 있으나 이 또한 증례 보고 수준임

#### (라) 스테로이드 (Steroid)

- 사이토카인 (cytokine)의 억제를 통해서 치료 효과를 예상해 볼 수 있지만. 2차 감염의 위험 등으로 치료에 있어서 추천하기 힘들

### ○ SFTS 바이러스의 백신개발 현황

- ▶ 현재까지 SFTS 바이러스에 유효한 예방백신이 없음
- ▶ 불활성화한 SFTS 바이러스를 이용한 백신 개발은 일본, 중국 등에서 일부 진행 중인 것으로 알려짐

#### (가) SFTS DNA 백신

- SFTS DNA 백신의 경우 BALB/c 마우스와 페럿 모델에서 중화항체와 SFTS 바이러스에 특이적인 T 세포 반응을 모두 유도하며 면역원성을 확인하였고, vaccinated 페럿 모델에서 lethal SFTS 바이러스 공격시험으로 어떤 임상 증상이 없이 SFTS 바이러스로부터 보호되었다는 것을 확인하였음<sup>6)</sup>

#### (나) 약독화 백신(live-attenuated vaccine)

- SFTS 바이러스를 이용한 약독화 백신은 NS (nonstructural)를 토대로 12개의 아미노산 (rHB2912aaNS)과 102번 위치의 proline을 alanine으로 point mutation 시킨 (rHB29NSsP102A) 재조합 SFTS 바이러스 백신을 이용하여 페럿 모델에서 면역원성과

3) Liu W, Lu QB, Cui N, et al. Case-fatality ratio and effectiveness of ribavirin therapy among hospitalized patients in china who had severe fever with thrombocytopenia syndrome. Clin Infect Dis 2013;57:1292-9.

4) Lu QB, Zhang SY, Cui N, et al. Common adverse events associated with ribavirin therapy for severe fever with thrombocytopenia syndrome. Antiviral Res 2015;119:19-22.

5) Oh WS, Heo ST, Kim SH, Choi WJ, Han MG, Kim JY. Plasma exchange and ribavirin for rapidly progressive severe fever with thrombocytopenia syndrome. Int J Infect Dis 2014;18:84-6.

6) Kwak, J. E.; Kim, Y. I.; Park, S. J.; Yu, M. A.; Kwon, H. I.; Eo, S.; Kim, T. S.; Seok, J.; Choi, W. S.; Jeong, J. H.; Lee, H.; Cho, Y.; Kwon, J. A.; Jeong, M.; Maslow, J. N.; Kim, Y. E.; Jeon, H.; Kim, K. K.; Shin, E. C.; Song, M. S.; Jung, J. U.; Choi, Y. K.; Park, S. H., Development of a SFTSV DNA vaccine that confers complete protection against lethal infection in ferrets. Nat Commun 2019, 10, (1), 3836.

예방효과를 입증하였음<sup>7)</sup>

## 2) 음극전기화학발광법(C-ECL:Cathodic Electrochemiluminescence)관련 기술 현황

### ○ C-ECL 진단 기술의 개요

- ▶ 글로벌 진단기기 기업인 Roche의 A-ECL 기술과 유사한 ECL 진단 기술로 현재 (주)바이오테트로와 Roche 두 기업만이 특허를 보유함
- ▶ C-ECL 기술은 기존의 대형분석 장비에 비해 빠른 시간(5-10분)에 별도의 전처리가 필요 없는 소량의 샘플(5  $\mu$ L 내외)로 정확/정밀하게 측정이 가능함

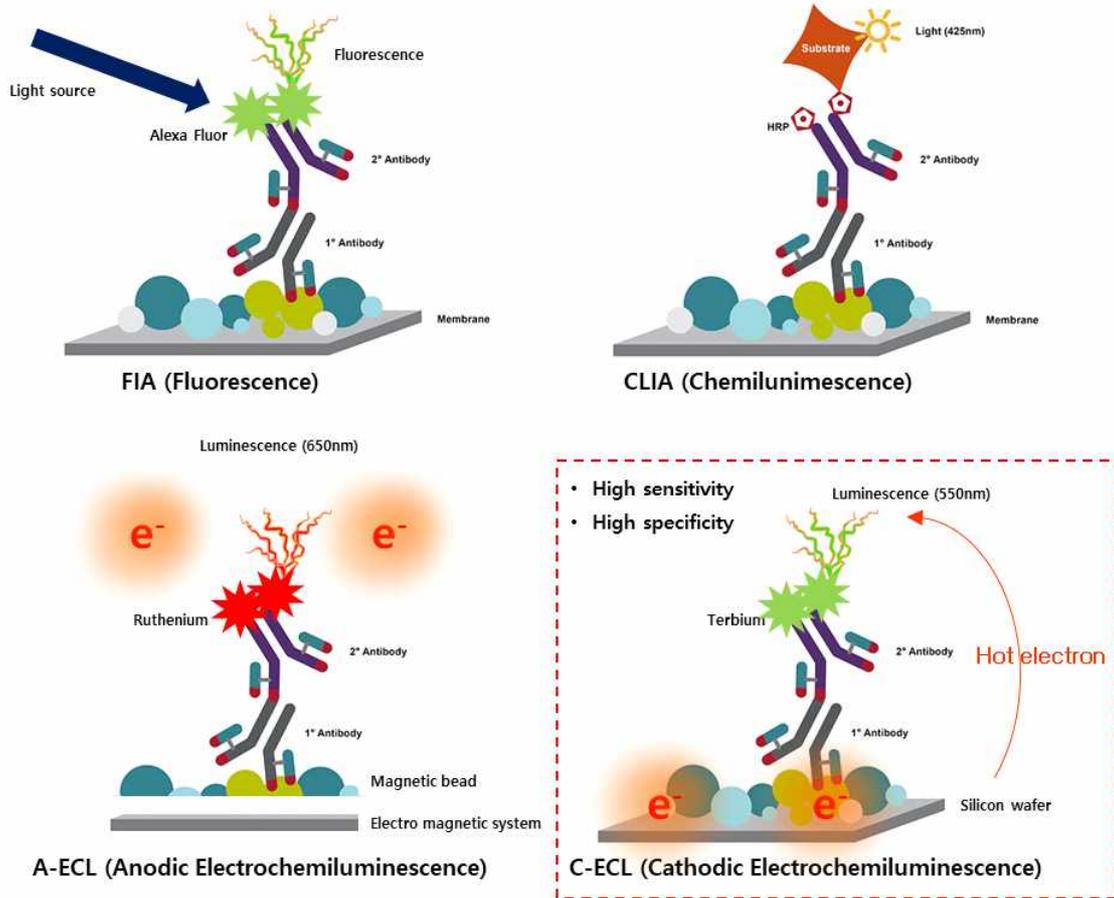


그림 2. 상용화된 진단 시스템 원리 비교

- ▶ 또한 현장형 진단기기(POCT)에 적용할 수 있도록 소형화가 가능하며, 하나의 시료로 여러 바이오마커의 다중분석(multiplexing)이 가능함
- ▶ 다중 분석을 통해 의료진에 여러 진단정보를 제공할 수 있으며 정밀도와 특이도를 증가시키고 위양성을 최소화할 수 있음

7) Yu, K. M.; Park, S. J.; Yu, M. A.; Kim, Y. I.; Choi, Y.; Jung, J. U.; Brennan, B.; Choi, Y. K., Cross-genotype protection of live-attenuated vaccine candidate for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in a ferret model. Proc Natl Acad Sci U S A 2019, 116, (52), 26900-8.

Diagnostic Technologies			High Mobility	High Sensitivity	High Speed	Easy to Operate	Low Cost
면역 진단	ELISA	형광	X	O	X	X	X
	Lateral Flow	발색/형광	O	X	O	O	O
	Western Blot	화학발광	X	X	X	X	X
	RIA	방사선	X	O	X	X	X
	FIA	형광	O	X	O	O	X
	EIA	형광	O	X	O	O	X
	A-ECL	전기발광	X	O	X	X	X
	C-ECL	전기발광	O	O	O	O	O
분자 진단	PCR	형광/화학발광	X	O	X	X	X
	Microarray	형광	X	O	X	X	X

그림 3. 상용화된 진단기술의 주요 특징

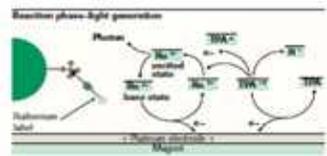
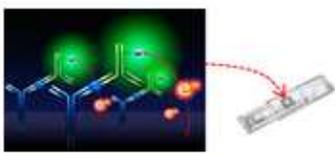
구분		A-ECL	C-ECL
핵심 기술		Anodic Electro-chemiluminescence	Cathodic Electro-chemiluminescence
			
성능	POCT	X	O
	샘플	Serum (Pre-processing 30min,)	Whole blood
	측정시간	약 48 min	5 ~ 10 min
경제성	시약	Test1회 당 25\$ 이상	매우 낮은 생산원가
	리더기	US\$ 429,000 ~ 624,000	매우 낮은 생산원가로 경쟁력 우수
디바이스	외형		
	크기/무게	498 x 130 x 120 (cm) / 1,320 kg	16 x 20 x 25 (cm) / < 1 kg

그림 4. A-ECL과 C-ECL 기술 및 제품 비교

○ C-ECL 진단기술의 원리

- ▶ 카트리지 내부에는 분석을 위한 바이오칩이 있고 표면에 미리 고정한 1차 항체, 발광물질이 결합된 2차 항체가 포함되어 있음
- ▶ 검체를 카트리지에 점적하고 바이오칩에 전기적 신호를 인가하면 전극의 표면에서 산화-환원 반응이 발생함

- ▶ 이때 2차 항체에 연결된 발광물질이 빛을 내고, 이 빛의 세기를 측정하여 검체 내의 표적량을 정량화함
- ▶ 측정에는 Time-resolved 기술을 적용하여 방해되는 노이즈를 효과적으로 감소시키고, 반복 사이클을 적용하여 민감도를 극대화함

## 1-2. 연구 개발의 중요성

### 1) SFTS 바이러스의 전파

#### ○ 진드기 매개 전파

- ▶ 자연계에서의 SFTS 바이러스는 진드기-진드기(transovarial and transstadial transmission), 동물 진드기간 감염고리를 형성하여 존재하다 감염된 진드기에 사람이나 동물이 물려 감염이 이루어짐
- ▶ 중증열성혈소판감소증후군은 SFTS 바이러스에 의해서 발생하는 급성 발열성 질환으로 매개체는 *Haemaphysalis longicornis* (작은소참진드기) *Amblyomma testudinarium* (뭉뚝참진드기), *Ixodes nipponensis* (일본참진드기) 등임
- ▶ SFTS는 진드기 매개 질병으로 주요 질병 매개체는 참진드기과(Ixodidae)로 분류하는 작은소피참진드기(그림1)이며 국내는 물론 중국, 일본, 호주, 뉴질랜드 등 아시아-태평양 지역에 널리 분포하며 산간 및 일부 지역을 제외한 전국에 걸쳐 비교적 고르게 분포

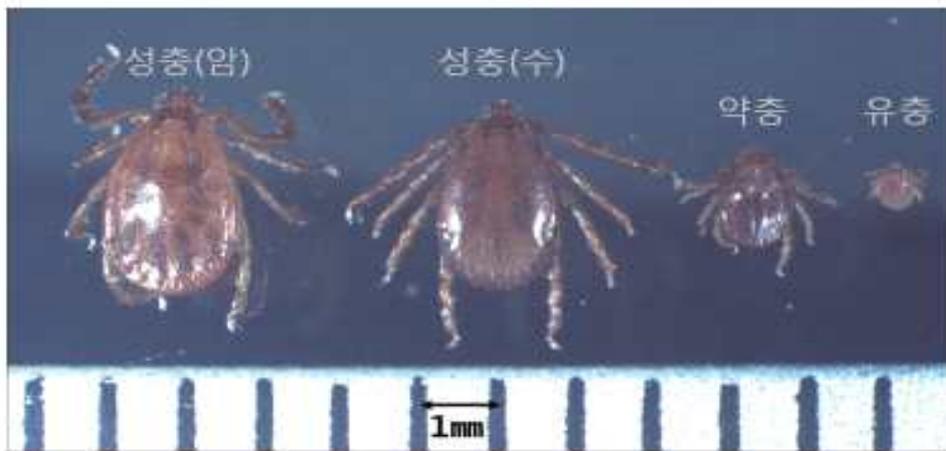


그림 5. 작은소피참진드기(*Haemaphysalis longicornis*, 질병관리청)

- ▶ 참진드기 전국 분포조사 현황 자료에 따르면 전국 채집 진드기의 96% 이상이 작은소피참진드기로 나타내며 국내에서는 **쯔쯔가무시증** 및 **중증열성혈소판감소증후군**이 **한국의 가장 흔한 진드기 매개 감염병**임

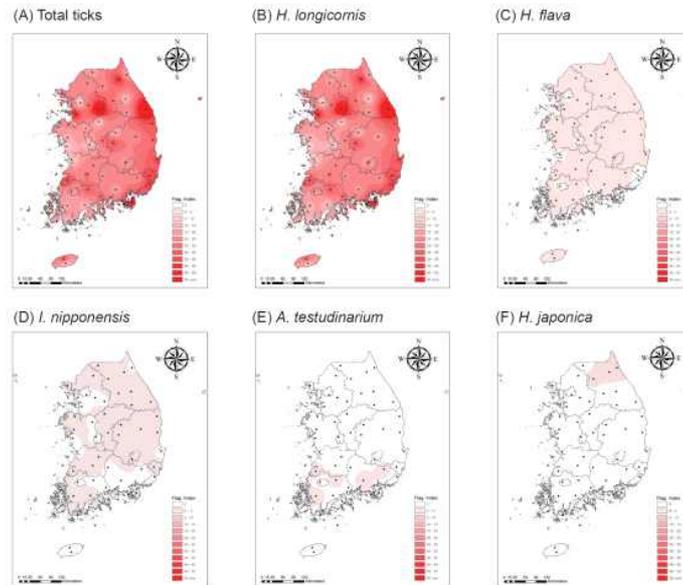


그림 6. 국내 주요 진드기 전국 분포현황(질병관리청, 2018) (A) 전체 진드기, (B) 작은소피참진드기(*Haemaphysalis longicornis*), (C) 개피참진드기(*H. flava*), (D) 일본참진드기(*Ixodes nipponensis*), (E) 뭇뚝참진드기(*Amblyomma testudinarium*), (F) 사슴피참진드기(*H. japonica*)

#### (가) 직접 전파

- SFTS는 진드기 매개 없이는 직접 접촉에 따른 전염은 쉽지 않으나 드물게 감염된 환자의 체액과 직접 접촉에 따른 감염 발생하며 감염된 동물로부터 사람으로 전파 의심 사례가 보고됨
- 야생고양에 물린 적이 있는 50대 여성이 SFTS로 사망 \* (2016년, 일본; ProMED-mail, 20170726.5204931)
- SFTS 바이러스 감염 반려견을 키우던 40대 남성이 SFTS 바이러스 감염 \* (2017년 6월, 일본; ProMED-mail, 20171012.5376692)
- 임상증상 발현 고양이 진료 수의사(여성)와 수의간호사(여성)가 SFTS 바이러스에 감염되어 치료 \* (2018년 7월, 일본; ProMED-mail, 20181211.6204927).
- SFTS 바이러스 감염으로 사망한 환자(80대, 남성)가 기르던 개에서 높은 수준의 SFTS 바이러스에 대한 항체 검출 \* (2018년 7월, 부산)
- 감염된 고양이 진료 수의사 SFTSV 감염 사례 \* (일본, Kida et al., 2019)

#### (나) 바이러스의 장거리 전파(국가간, 대륙간)

- SFTS는 2011년 중국에서 처음 확인되어 한중일 3국에서 주로 발생하고 있는 상황
- 바이러스 유전자 염기서열 분석 결과 이들 국가에서 유행하는 바이러스간 높은 상동성 확인
- 다양한 야생조류 중에서 SFTS 바이러스에 감염(항체 양성 개체)이 확인되고 있으며 지리적으로 3국이 동일 야생조류 이동경로 상에 위치하고 있어 국가간 야생조류의 이동(바이러스에 감염된 조류의 이동 또는 감염된 진드기가 조류를 흡혈하며 함께 이동)에 따른 장거리 바이러스 전파 가능성 제기<sup>8)</sup>
- 국가 간 교류 확대와 기후변화 등으로 최근 지카바이러스감염증, 중증열성혈소판감소증

8) Fu, Y., Li, S., Zhang, Z. et al. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean. Sci Rep 6, 19563 (2016).

후군과 같은 신종감염병들이 국제적으로 확산되고 있고, 진단기술의 발달로 보고 빈도 또한 점차 증가 추세임. 국제사회에서도 감염병 발생에 대한 공조체계의 중요성과 더불어 감염병 유행 대비 태세 강화의 필요성을 절실하게 인식하고 있음

## 2) 기후변화에 의한 매개체 관련 질병의 급속한 확산

- 기상청 자료에 의하면 11월 기후가 1973년에 비해 2011년까지 꾸준히 온도가 상승하고 있으며, 지금과 같은 추세라면 2040년과 2090년에는 여름철이 5월 초순으로 일찍 시작하고 늦게까지 지속되며 1년 중 거의 절반이 여름이 될 수도 있음<sup>9)10)</sup>
- 지구 온난화로 매개체 관련 질병 및 신종감염병의 발생 빈도 증가
  - ▶ 기온이 증가하는 봄부터 늦가을까지 진드기의 활동이 시작되고 지구 온난화로 인해 곤충의 개체수 및 병원균의 부화율이 증가하게 되며, 따뜻해진 겨울이 곤충 매개체 및 병원체 매개 생물의 생존에 유리하게 작용할 수 있음. 지구 온난화로 인해 곤충이나 설치류를 매개로 하는 질환이 앞으로 계속 증가할 가능성이 매우 높음



그림 7. 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 월별 환자 발생 현황(2014-2018)(질병관리청)

- ▶ 한국은 기후변화가 가장 빠른 국가이며, 다양한 진드기 매개체가 전국에 널리 분포하고 있으므로 매개체 관련 감염병의 빠른 확산 가능성이 큼

## 3) 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 연구의 필요성

- 중증열성혈소판감소증후군은 SFTS 바이러스에 의해서 발생하는 급성 발열성 질환으로 매개체는 *Haemaphysalis longicornis* (작은소참드기)는 SFTS의 국내 대표적인 매개체로 뚜렷한 지역적 차이 없이, 산간 및 일부 지역을 제외한 전국에 고르게 분포하고 있으며, 이는 SFTS 감염병의 전국적인 분포를 대변해줌 (그림2)
- 2011년 중국에서 중증열성혈소판감소증후군(SFTS)이 처음 확인되었고, 국내에서는 2013년 국내 첫 환자 확인 이후 매년 발생이 증가하고 있으며, 사망률이 20%에 달함 (그림 1)

9) 기후변화에 따른 전염병관리분야 적응대책, 한국 보건사회 연구원

10) 기상청 (www.kma.go.kr)



그림 8. 2013~2020년 질병관리청에 따른 연도 별 SFTS 발생 현황(환자수와 사망자수) 2018 SFTS 치료 연구최종결과보고서(국내 SFTS 환자의 치료효과 분석을 통한 중증환자 치료지침 권고안 개발)

#### 4) 신속진단기기 개발 및 상용화의 필요성

##### ○ 현장형 진단기술의 부재

- ▶ 현재 개발된 SFTS 항체진단기술은 바이러스 중화시험법(VN test), 간접형광항체법(IFA), 효소면역법(ELISA) 등이 있음
- ▶ 이들 검사 방법은 높은 일치율을 보이거나 검사소요시간이 길고(3시간 이상) 한 번에 많은 양을 처리해야 하는 단점이 있음
- ▶ 이로 인해 검사 장벽이 높아 SFTS 바이러스의 추적조사가 어렵고 사람과 반려동물 모두의 생명과 건강을 위협함
- ▶ 높은 정확도와 민감도를 갖고 짧은 시간에 수행할 수 있는 검사방법의 필요성이 대두됨
- ▶ 검사의 접근성을 높이기 위해 중/대형 병원에서 신속하게 검사가 가능한 고감도 진단기술인 C-ECL을 이용한 신속진단키트와 소형병원과 가정 등 현장에서 바로 진단이 가능한 LFA를 이용한 신속진단 키트를 동시에 개발하여 사용 편의성과 진단 정확도를 모두 충족할 제품을 개발 예정

#### 5) 진단기기의 핵심소재 NC 멤브레인 개발의 필요성

##### ○ (NC멤브레인) NC멤브레인은 주요 3대 플레이어가 대부분을 독과점하는 시장임

- ▶ 미국의 Merck와 GE Healthcare, 독일의 Sartorius 등 3개 거대 기업의 시장 점유율은 58.94%에 이르며 독과점 시장을 형성하고 있음
- ▶ NC멤브레인의 주요 기술은 제조기술이며, 제조 로트(Lot)별 편차가 커 글로벌 기업의 제품이 아닌 경우에 해당 기술에 대한 수요처의 불신이 가장 큰 시장의 진입장벽이 될 수 있으므로 이에 대한 적극적인 연구개발이 필요함

##### ○ 소재부품 국산화 및 전략제품의 국내 생산 거점 기반 마련

- ▶ 진단기기 기업의 위상은 K바이오로 높아졌지만, 국산화가 전무한 상태로써 NC 멤브레인 부터 진단기기 LFA 기술에 대한 기술 확보와 상용화는 필수적임



그림 9. 진단키트 소재부품 시장

- ▶ 소재의 특성과 소재를 안배한 유동해석 등 다양한 분야의 융합연구가 필수적임에도 국내의 현실은 붙여서 잘라서 조립해서 쓰는 것임

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### ❖ 주관연구개발기관 - (주)바이오메트로

#### <1차년도>

##### 1) LFA용 카트리지 구조 최적화

- ✓ 고성능 동물용 SFTS 항체 진단키트 개발을 위해 전용 카트리지 설계 및 금형 제작
- ✓ 시료의 양과 전개 속도 등을 고려하여 설계
- ✓ IgG/IgM (3 라인) or Total Ab (2 라인) 두 가지 타입에 모두 적용이 가능하도록 Control, Test 라인 표시 부분은 가변영역으로 제작

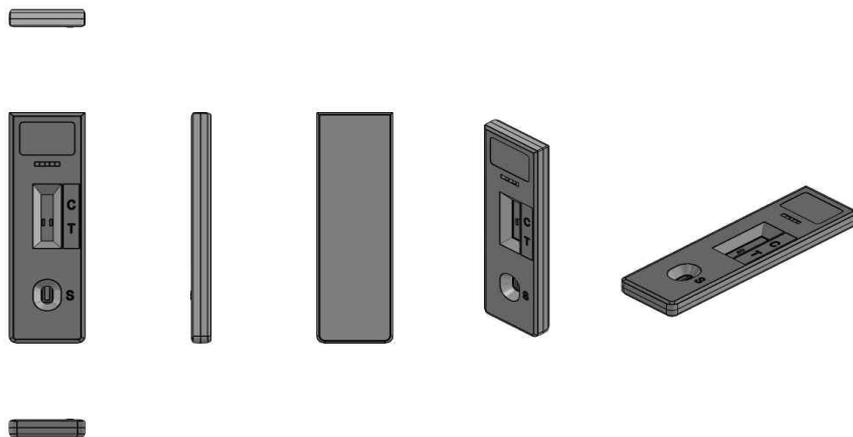


그림 10. LFA용 카트리지 구조

##### 2) C-ECL 진단기기 성능개선 (SiPM)

- ✓ SiPM 모듈 제작 및 냉각소자(펄티어)를 적용한 dark noise 개선
  - 알루미늄을 적용한 소형 SiPM 모듈 제작 및 온도, 기압 모니터링 센서 추가
  - Dark noise 개선을 위해 펄티어 소자를 SiPM 센서 후면에 장착
  - 설정온도(-30℃)에서 상온(25℃)대비 photon count 1/90 수준으로 감소

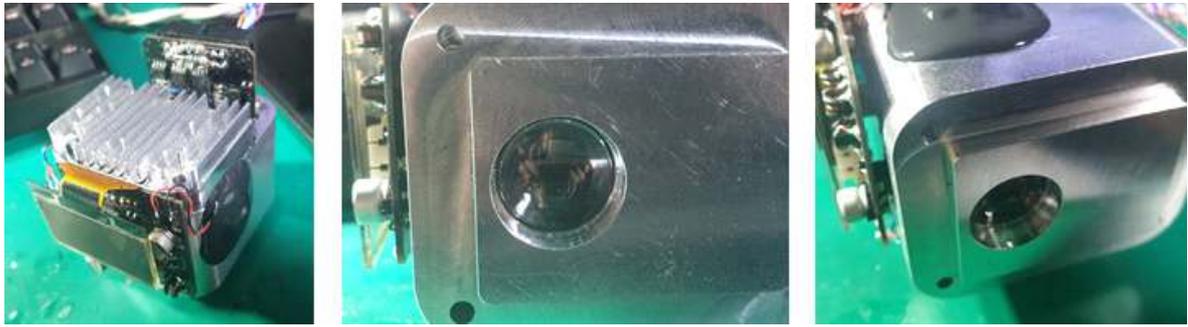


그림 11. 냉각소자 외관

- ✓ SiPM 모듈 진공 유지를 위한 하우징 구조 설계 변경
  - 온도 변화 시 수축팽창률 차이로 인한 공기유입과 결로 생성 문제
  - 장시간 사용 시 결로가 측정결과 오차 발생
  - 하우징 사이에 오링(o-ring)을 추가하여 몰딩으로 공기유입 차단

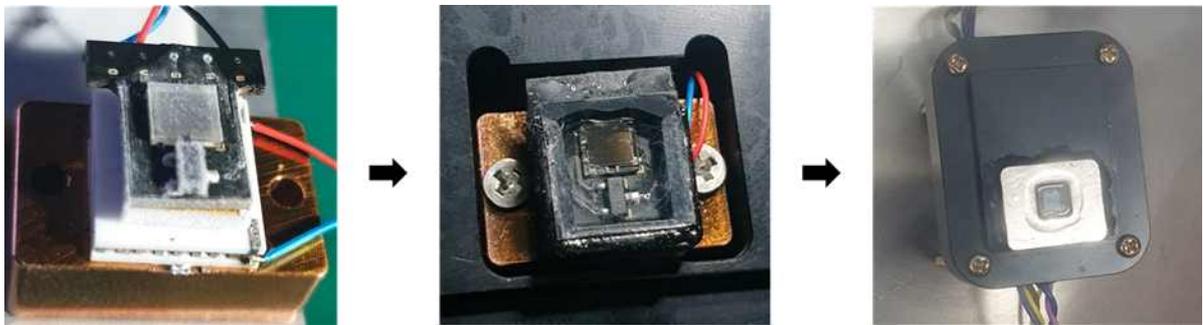


그림 12. 냉각소자 내부 구조

- ✓ 광학구조 개선을 통한 성능 향상
  - 카트리지에서 발생하는 빛을 집광하여 집광효율 향상
  - 두 개의 볼록렌즈를 SiPM 모듈 내에 장착하여 FOV를 70°까지 증가
  - 기존 대비 약 3.5배 증대 효과

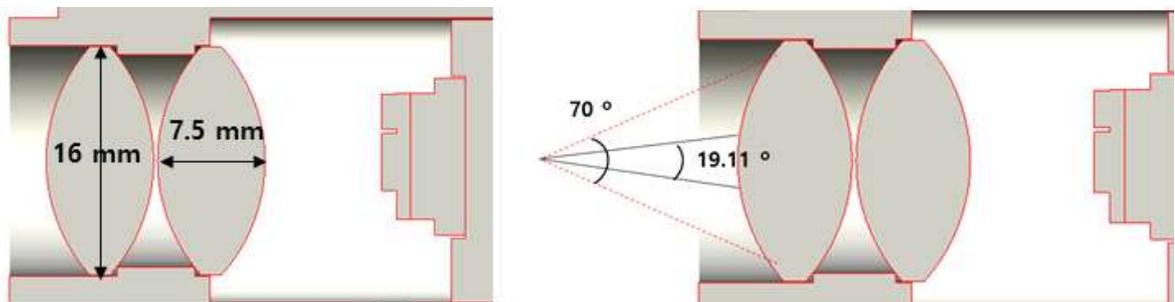


그림 13. 광학구조 모식도

- ✓ 실용성과 사용자 편의성이 강조된 진단기기 디자인 설계 변경
  - 기존의 진단기기 디자인은 휴대성에 중점을 두어 설계했지만, LCD디스플레이 패널이 작고 카트리지 장착에 제약이 있어 진단기기 디자인 설계를 변경
  - 기존에 설계된 2인치 mono color LCD에서 5인치 color LCD 모듈로 변경
  - 진단기기의 사용처를 고려하여 감압식 터치패널 추가

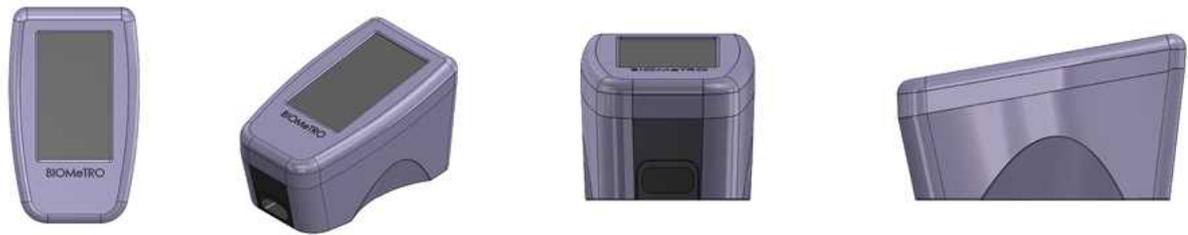


그림 14. 진단기기 외부 디자인

✓ GUI(Graphic User Interface) 구성

- 측정, 결과분석, 설정 변경 등을 진단기기에서 손쉽게 진행할 수 있도록 GUI 구성 및 디자인 제작
- LCD 화면이 작기 때문에 사용 에러를 감소시킬 수 있도록 간단하지만 시인성이 높은 GUI 구성

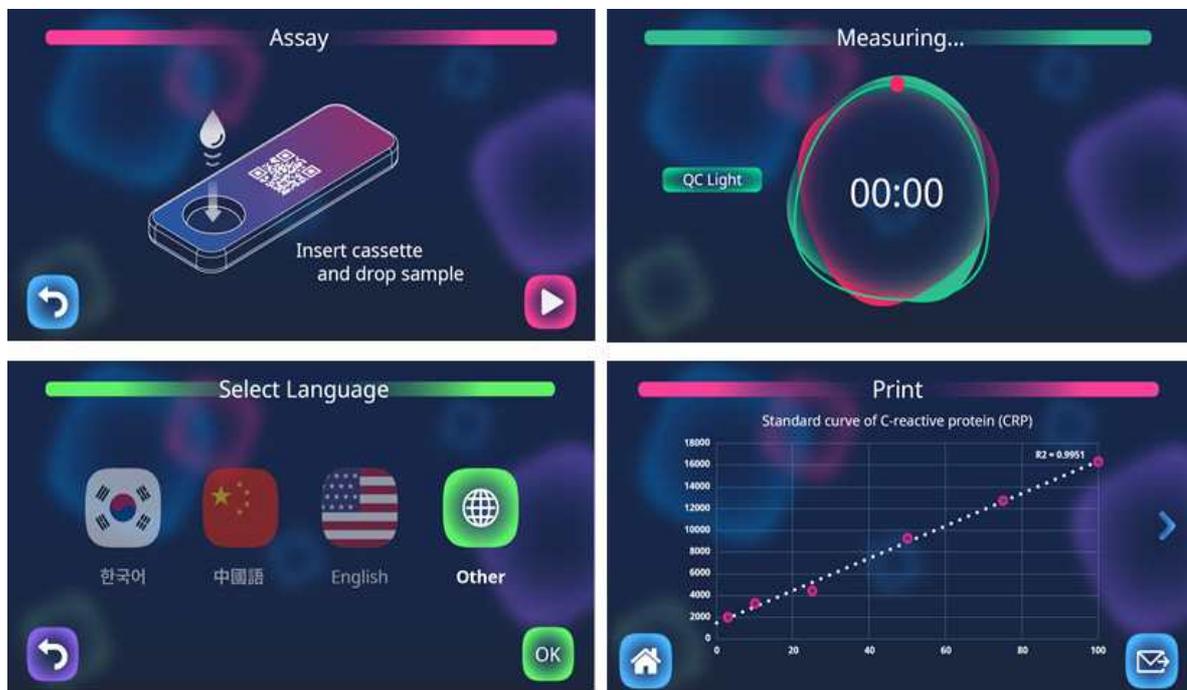


그림 15. 진단기기 GUI

3) C-ECL 진단기기 항원/항체 안정화 테스트

✓ 항원/항체 안정화를 위한 Blocking Buffer 조건 테스트 진행

- Blocking buffer C-ECL 진단의 기존 protocol에서 성분인 BSA 원재료 변경 및 첨가 조건 최적화 진행함
- BSA 대체 물질로 Casein을 추가하여 실험을 진행함

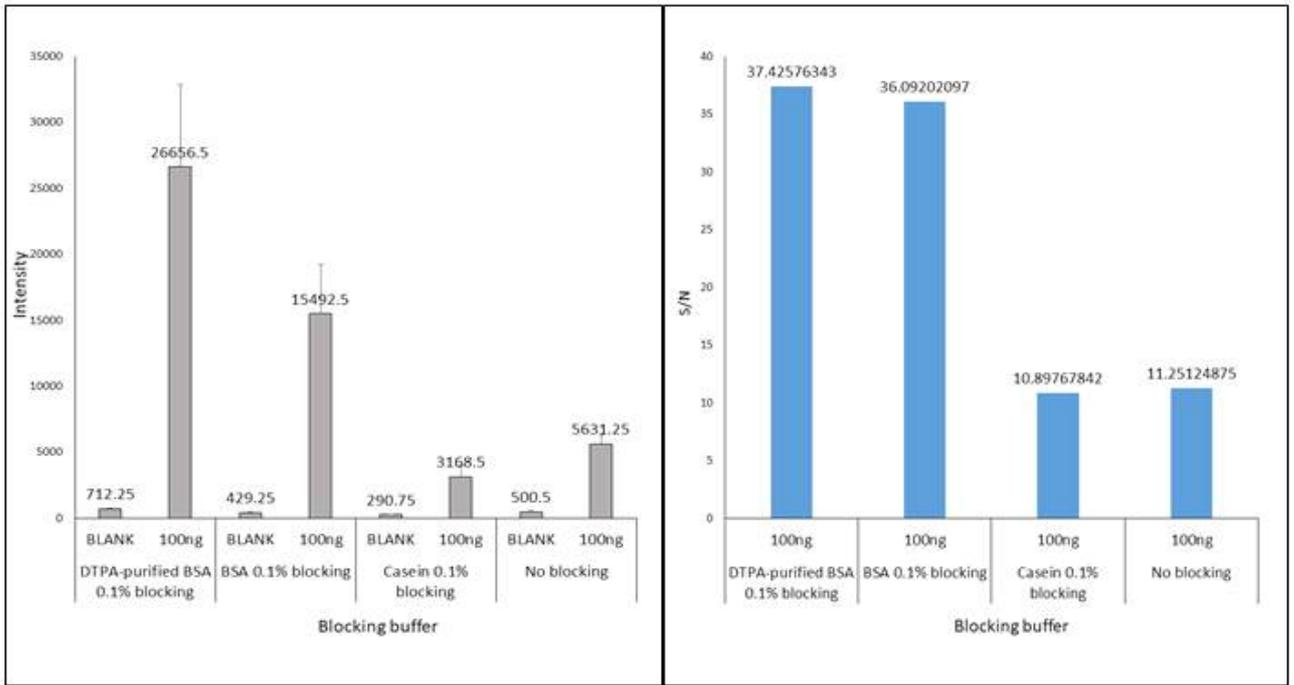


그림 16. Blocking buffer 조건 테스트

- DTPA 정제 BSA와 일반 BSA 둘 다 유사한 S/N값을 보임
- 추후 진단 키트 생산 단가를 고려하여 가격이 상대적으로 저렴한 일반 BSA로 대체 가능
- 실험결과 casein은 blocking buffer 성분으로 부적합함

#### 4) C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화

- ✓ 기존 고정화 방식으로 고정 버퍼 변경 테스트 진행
  - 버퍼 변경 테스트 결과 고정화 베이스 버퍼로 TSA 혹은 PBS 사용 가능
  - Sodium carbonate 버퍼는 사용하기 어려워 보임

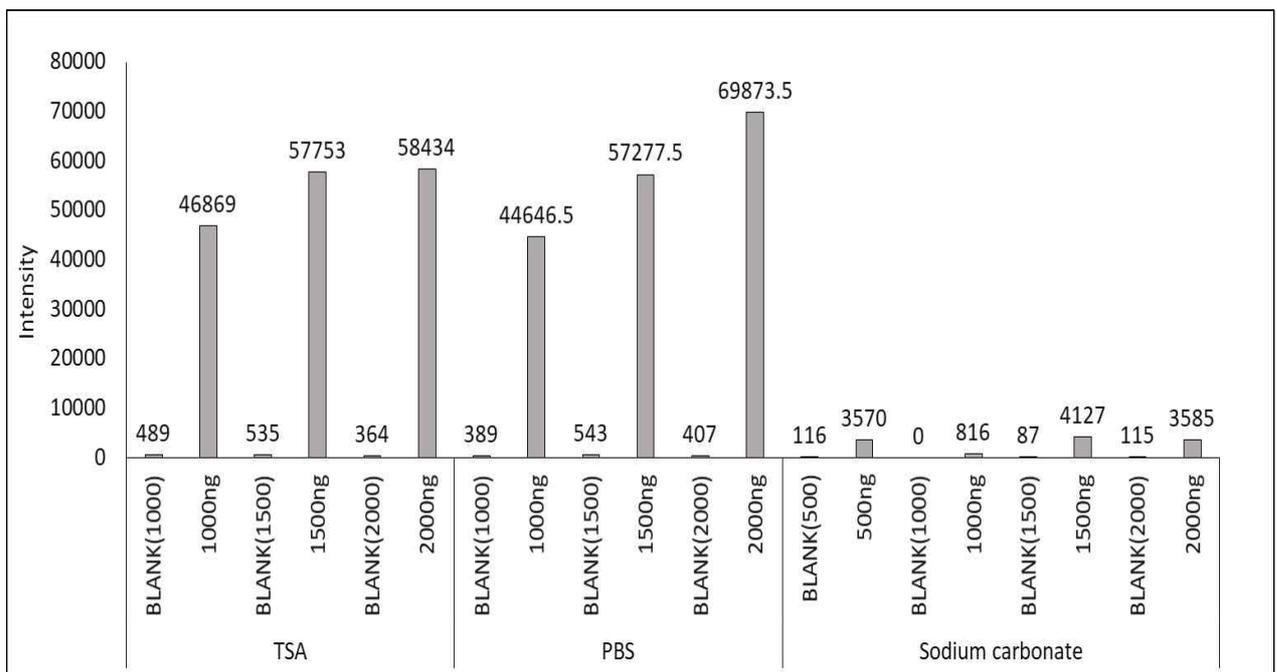


그림 17. 고정 buffer 변경 테스트

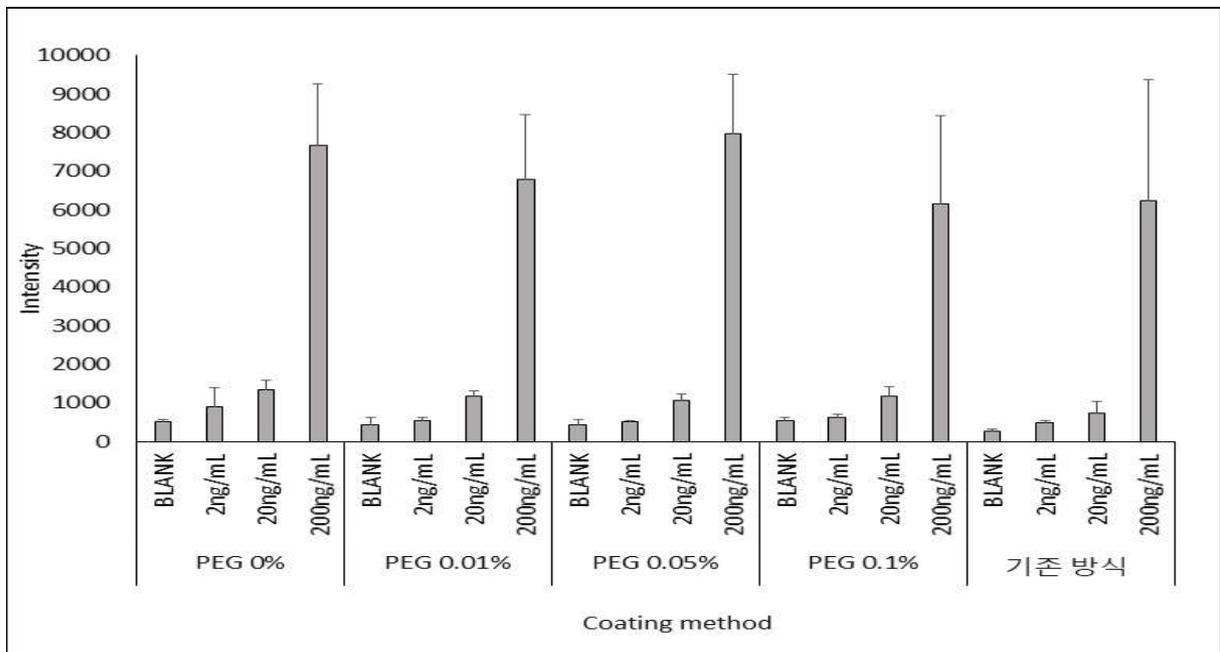


그림 18. 고정 buffer 조성 변경 테스트

- 추가적으로 PEG를 적용하였으나 성능에 큰 변화 없음

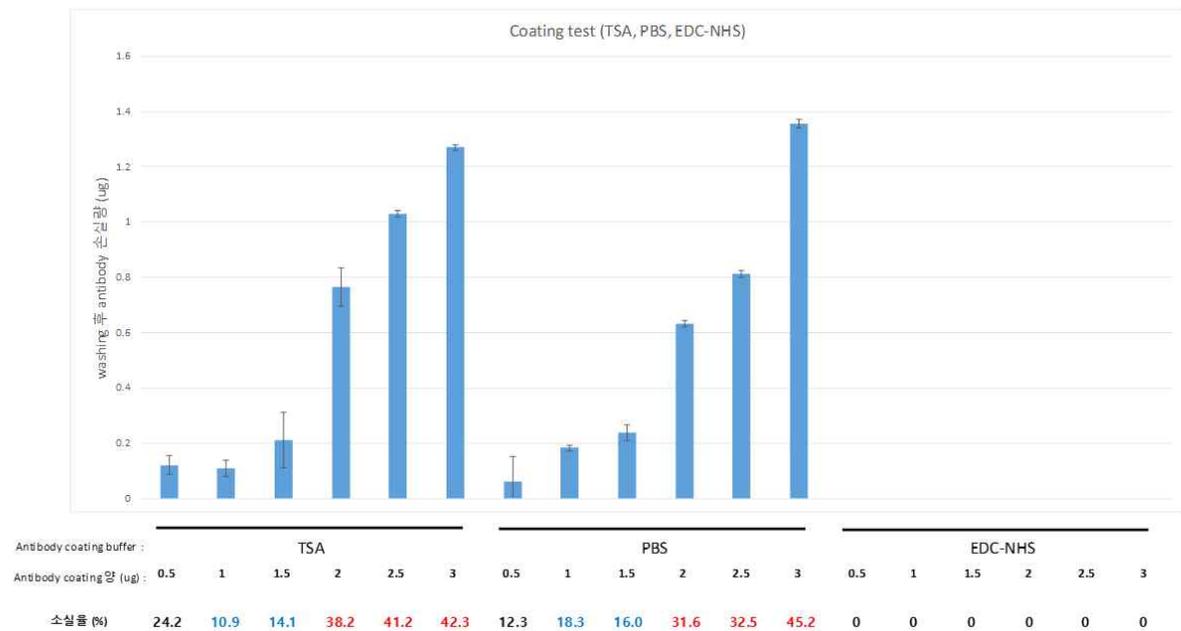


그림 19. 고정화 항체양 최적화

- EDC/NHS 코팅으로 고정화 적용시, 항체 소실이 발생하지 않고 웨이퍼에 고정되는 것을 확인

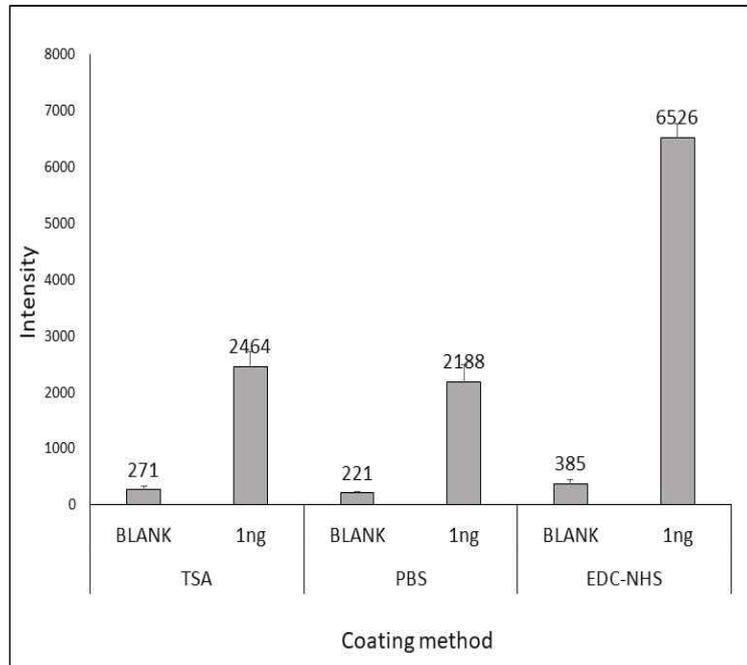


그림 20. 고정화 방법 최적화

- EDC/NHS 코팅방법으로 비교 확인 결과 더 높은 S/N결과를 보여 고정화에 가장 적합한 방법으로 확인됨
- 추후 민감도 및 측정 범위 CV 등의 성능 검토 예정

### 5) 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용

- ✓ 최적의 발광물질을 선정하기 위해 Ruthenium과 기존의 Terbium을 적용했을 때 C-ECL 결과 비교
  - Ruthenium C-ECL 결과 기존 Terbium과 유사한 성능을 보임
  - Ruthenium을 활용하여 다중진단에 적용 가능할 것으로 판단됨

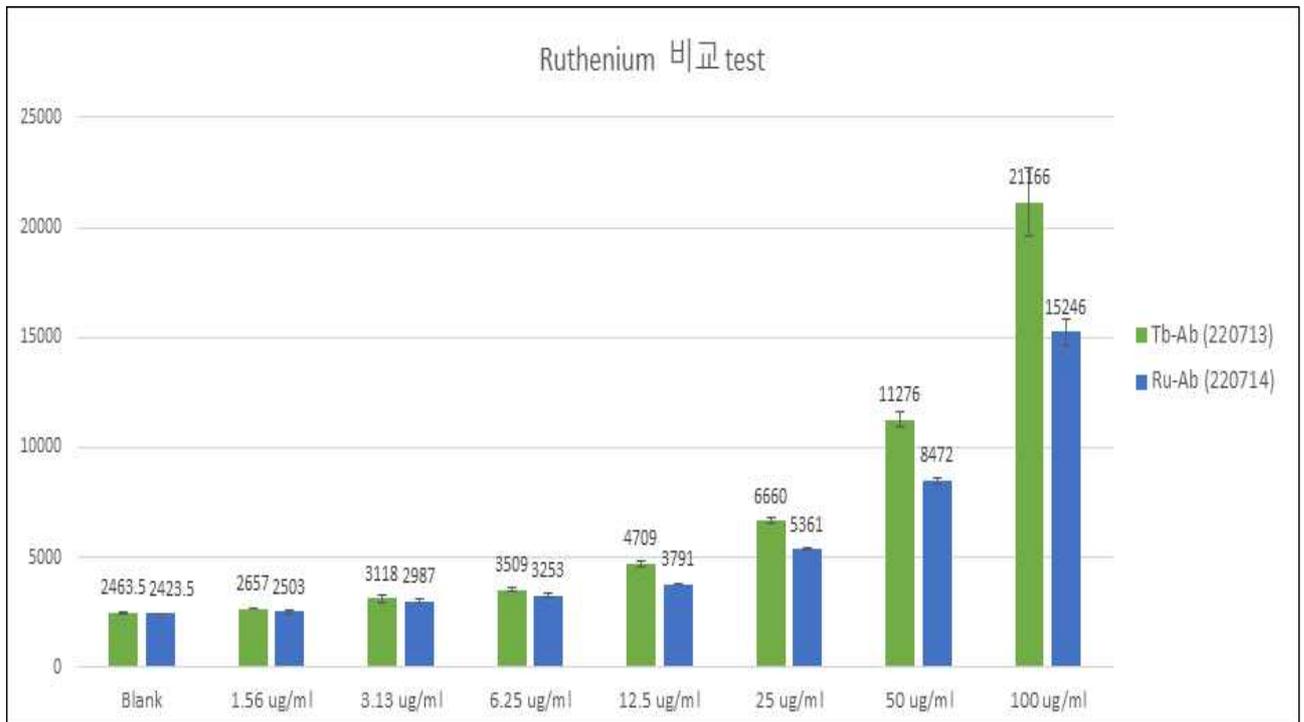


그림 21. Ruthenium 농도별 적용

## 6) 민감도 특이도 평가

### ✓ SFTS NP 성능 비교 DELFIA test

- 위탁연구기관인 조선대학교에서 제공한 SFTS 항원의 진단 키트로의 제작 가능 여부를 DELFIA test로 확인

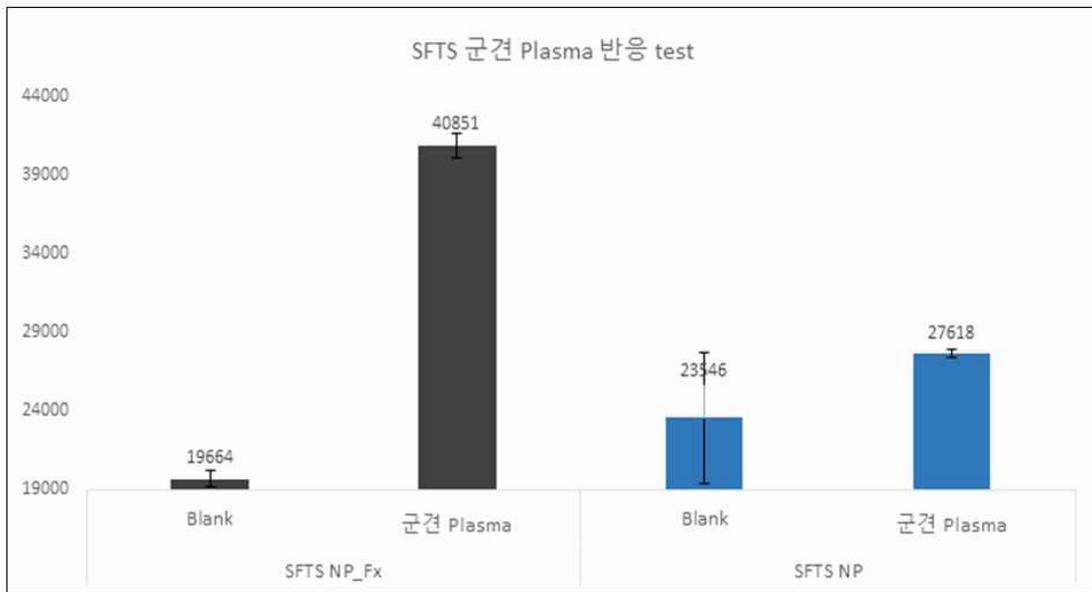
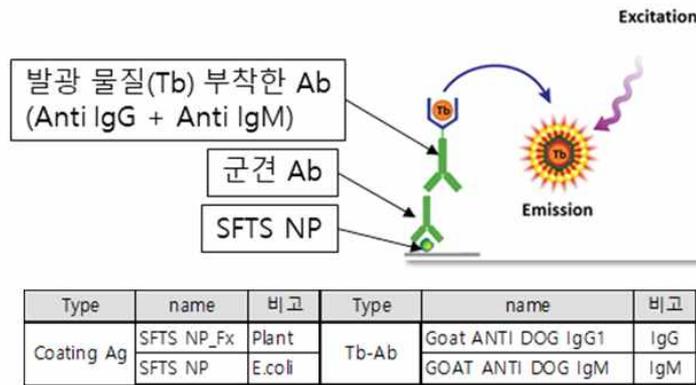


그림 22. 실검체 DELFIA 테스트

- SFTS NP\_Fx(Plant source)와 SFTS NP(E.coli source) 두 가지 항원에 대한 반응성 확인 진행함
- SFTS NP\_Fx(Plant source) 항원 반응성이 더 높음을 확인
- C-ECL 적용 가능성이 높은 항원임을 확인함

### ✓ 선정된 항원을 C-ECL에 적용한 결과

		음성	저	중	고
결과	1회	41	40	98	214
	2회	40	41	96	259
	3회	46	38	82	231
평균		42	40	92	235
CV		7.593	3.851	9.476	9.683

- C-ECL 실험결과 중농도의 표준물질까지 검출 가능하다는 것을 확인하였음

✓ 선정된 항원을 LFA에 적용한 결과

- SFTS IgG/IgM 항체를 구분하여 검출가능 하도록 3line으로 멤브레인 제작함. strip형태로 표준물질 (음성, 저, 중, 고농도)를 이용하여 결과 확인함.

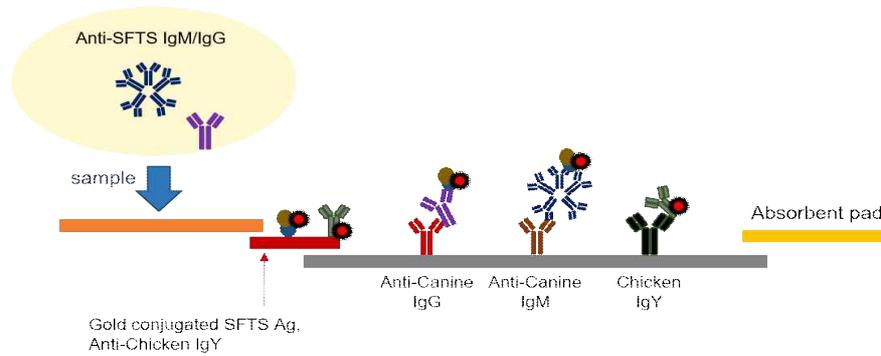


그림 23. 3line 모식도

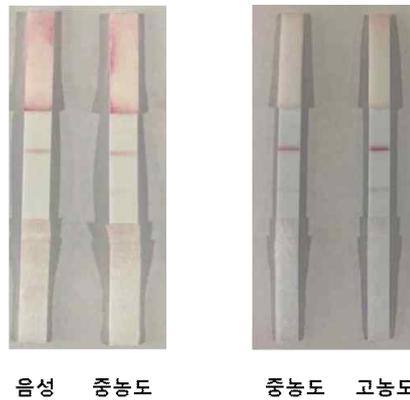


그림 24. 3line 표준물질 테스트

- SFTS IgG의 경우 중농도에서 비교적 선명하게 라인이 나타나지만, SFTS IgM의 경우 고농도에서도 라인이 거의 나타나지 않음. 현재 단계에서는 SFTS IgG/IgM을 구분하는 것이 큰 의미가 없다고 판단되어 구분하지 않고 total SFTS Ab를 검출할 수 있도록 SFTS Ag을 테스트 라인에 분주하여 2line으로 멤브레인 제작함. strip형태로 표준물질 (음성, 저, 중, 고농도)를 이용하여 결과 확인함.

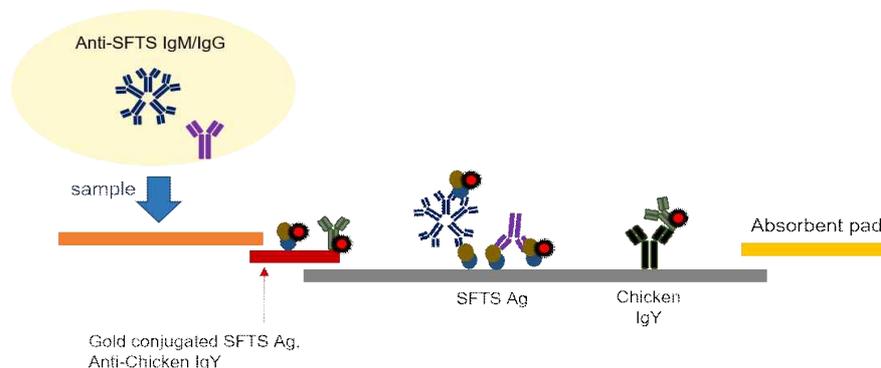


그림 25. 2line 모식도

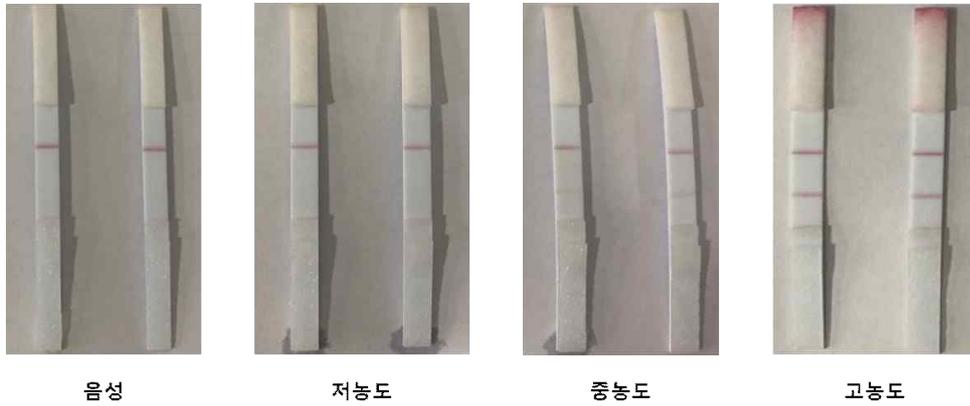


그림 26. 2line 표준물질 테스트

- strip 형태에서 확인한 결과, 음성 및 저농도에서는 검출되지 않았고 중농도 및 고농도에서 라인이 확인됨. 동일한 strip을 제작한 housing에 조립한 후 같은 조건으로 실험하여 결과값에 영향을 미치는지 확인함.

		음성	저	중	고
결과	1회				
		-	-	+	++
	2회				
		-	-	+	++
	3회				
		-	-	+	++

그림 27. 표준물질 테스트

- 그 결과, housing에 조립하여도 동일하게 음성 및 저농도에서는 검출되지 않았고, 중농도부터 약하게 라인이 확인되었음. 중농도와 고농도의 결과값 비교 시 유의미한 차이가 보였음.
- 현재 항원 조합으로 C-ECL과 마찬가지로 LFA에서도 중농도의 표준물질까지 검출이 가능하다는 것을 확인하였음
- 2차년도에 위탁연구기관에서 제작한 다양한 항원을 사용하여 최적화 실험을 진행할 예정임

### 7) 장기 보관 안정성 평가

- ✓ 상온보관을 기준으로 3주간 50도 가속노화 테스트 (약 3개월 보관 테스트)
- ✓ 양성(중농도)/음성 두 가지 표준물질을 주차별로 각각 3회 측정
- ✓ C-ECL, LFA 두 진단 키트 모두 테스트 수행함

$$AAF = Q_{10}^{[(T_{AA}-T_{RT})/10]} \quad (1)$$

$T_{AA}$  ≡ 가속노화온도 (°C)

$T_{RT}$  ≡ 주변 온도 (°C)

$$AAF = 2^{[(50-30)/10]} = 4$$

가속노화시간(AAT)=설정된 (RT)/AAF

$$21 = \text{설정된 (RT)}/4 \Rightarrow \text{설정된 (RT)} = 84\text{일} \approx \text{약 3개월}$$

- ✓ C-ECL 결과

		0		1주		2주		3주	
		음성	양성	음성	양성	음성	양성	음성	양성
결과	1회	40	95	37	92	43	90	48	95
	2회	43	91	45	89	48	87	42	91
	3회	39	97	41	87	42	93	44	88
평균		41	94	41	89	44	90	45	91
CV		5.119	3.239	9.756	2.817	7.251	3.333	6.840	3.845

- ✓ LFA 결과

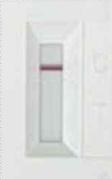
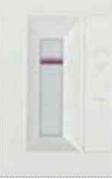
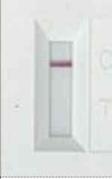
		0		1주		2주		3주	
		음성	양성	음성	양성	음성	양성	음성	양성
결과	1회								
		-	+	-	+	-	+	-	+
		2회							
	-		+	-	+	-	+	-	+
	3회								
		-	+	-	+	-	+	-	+

그림 28. 장기 보관 안정성 테스트

- 3주차까지 가속노화하여 확인한 결과, C-ECL, LFA 모두 제조 당일 테스트한 결과값과 비교하여 큰 차이가 보이지 않으므로 약 3개월간 키트가 상온에서 유효하다고 판단함.

### 8) 물리 화학적 밸리데이션 수행

✓ Buffer pH 변화에 따른 결과 테스트

✓ C-ECL 결과

pH		5		6		7		8		9	
표준물질		음성	양성								
결과	1회	31	35	35	45	41	91	42	74	39	32
	2회	32	37	38	48	47	92	45	79	36	39
	3회	30	39	32	45	42	85	49	68	38	33
평균		31	37	35	41	43	89	45	74	38	35
CV		3.226	5.405	8.571	7.317	7.418	4.238	7.747	7.476	4.055	10.921

- 전개용액의 pH변화에 따른 결과값을 비교해보았을 때, pH7~pH8까지는 결과값이 비슷한 패턴으로 유지되었으나 그 범위 이상 낮아지거나 높아지게 되면 결과값이 검출이 되지 않음을 확인함.

✓ LFA 결과

		pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
		음성	양성								
결과	1회										
		-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
	2회										
		-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
	3회										
		-	-	-	+	-	+	-	+	-	-

그림 29. 전개 Buffer pH 테스트

- 전개용액의 pH변화에 따른 결과값을 비교해보았을 때, pH6~pH8까지는 결과값이 동일하게 유지되었으나 그 범위 이상 낮아지거나 높아지게 되면 정상적으로 결과값이 검출이 되지 않음을 확인함.

### 9) 시제품 제작

- ✓ 1차년도 실험 결과를 바탕으로 하여 1차 임시 시제품을 C-ECL, LFA 타입으로 각각 100 Test 씩 제작하여 실험에 사용하였음

### <2차년도>

#### 1) 실검체 표준물질 제작

- ✓ 동물용 SFTS 항체 진단키트 개발을 위해 실검체를 이용한 표준물질 제작
- ✓ 수집된 동물 실검체를 사용하여 조선대에서 개발한 indirect ELISA protocol을 수행하고 역가를 확인

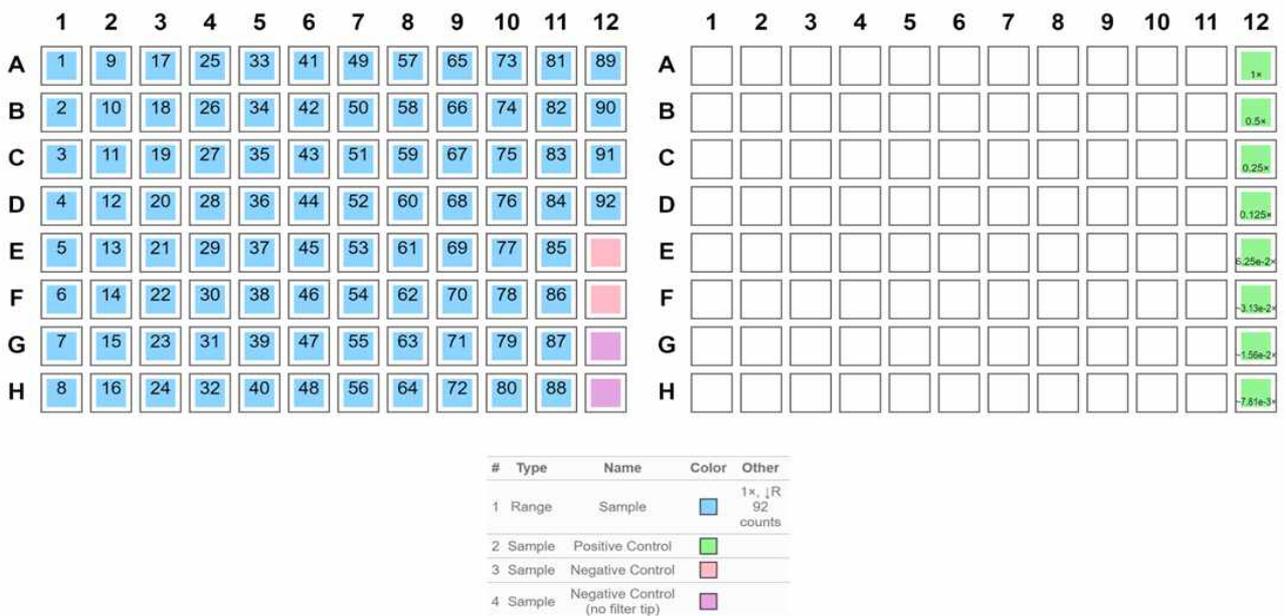


그림 30. Indirect ELISA setting

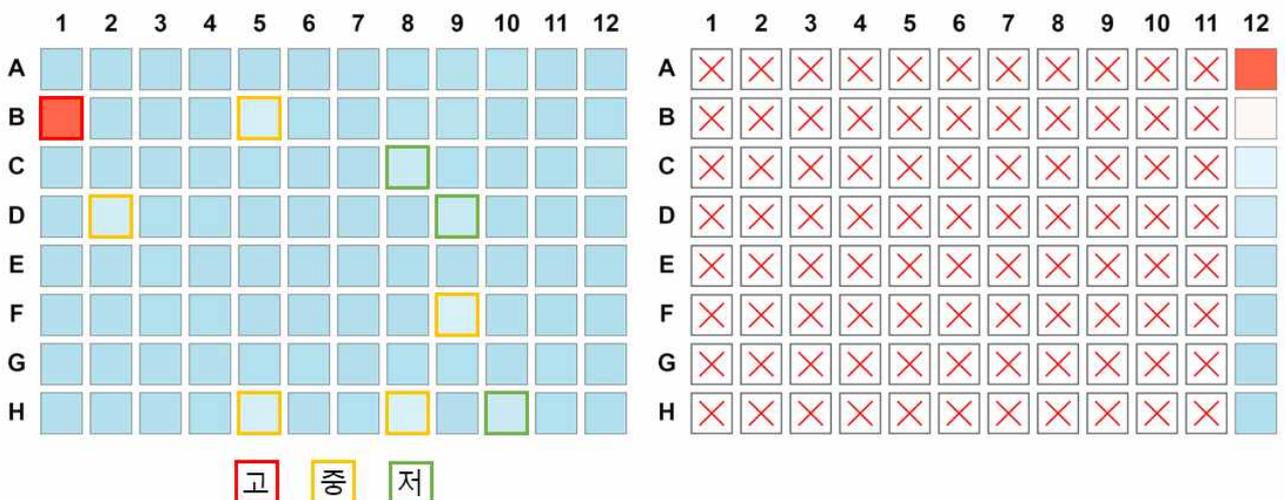


그림 31. Indirect ELISA 결과

고농도 - 1점대 이상의 흡광도 : 2

중농도 - 0.3점대 이상의 흡광도 : 12, 34, 40, 64, 70

저농도 - 0.2점대 이상의 흡광도 : 59, 68, 80

- 일부 검체에서 양성으로 판단할 수 있는 흡광도를 보여 이를 pooling하고 각각 고농도, 중농도, 저농도 표준물질이라 정하고 이후 시험에 사용하고자 함

## 2) NC 멤브레인 동등성 테스트 (LFA)

✓ 기성제품 멤브레인과 유폴에서 제공된 멤브레인의 성능을 비교

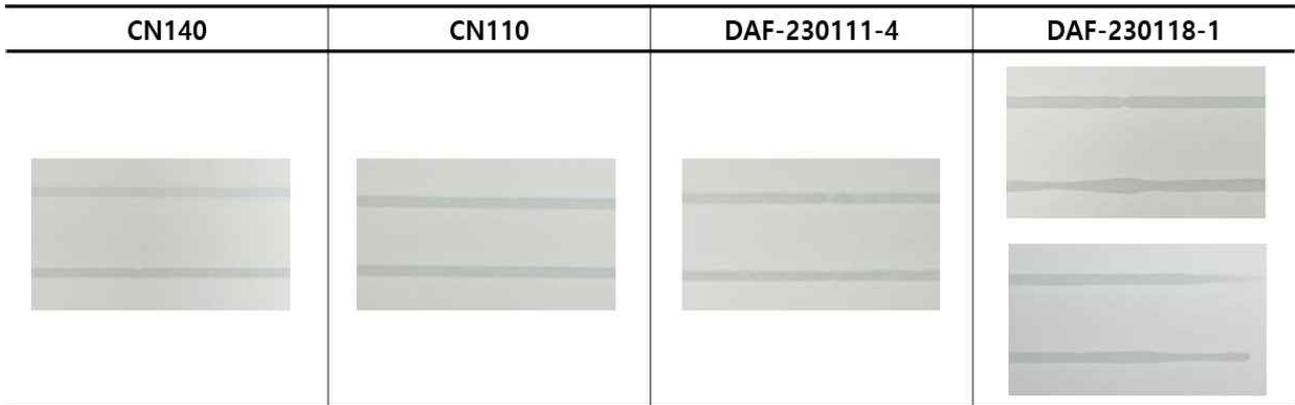


그림 32. 멤브레인 비교 테스트 (분주 양상)

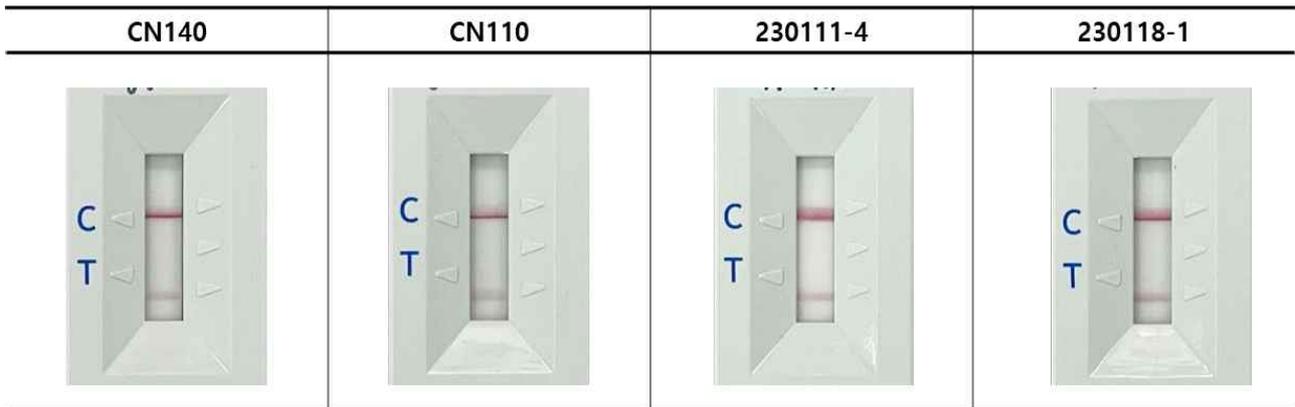


그림 33. 멤브레인 비교 테스트 (Au 점적)

- 참여기관인 유폴에서 제공된 멤브레인 중 일부 분주가 균일하지 못한 곳이 있었으나 임의의 strip 1개로 Au 점적 실험에서는 기정 제품과 동일한 수준의 성능을 보이는 것을 확인하여 CN140 멤브레인 대신 DAF-140UT 제품을 사용하기로 하였음

## 3) 최적화 테스트 (LFA)

✓ 조선대에서 제공한 Ag을 이용하여 아래 그림과 같은 모델로 conjugation 및 라인분주 농도를 조절하여 조건을 다양화하여 민감도를 확인

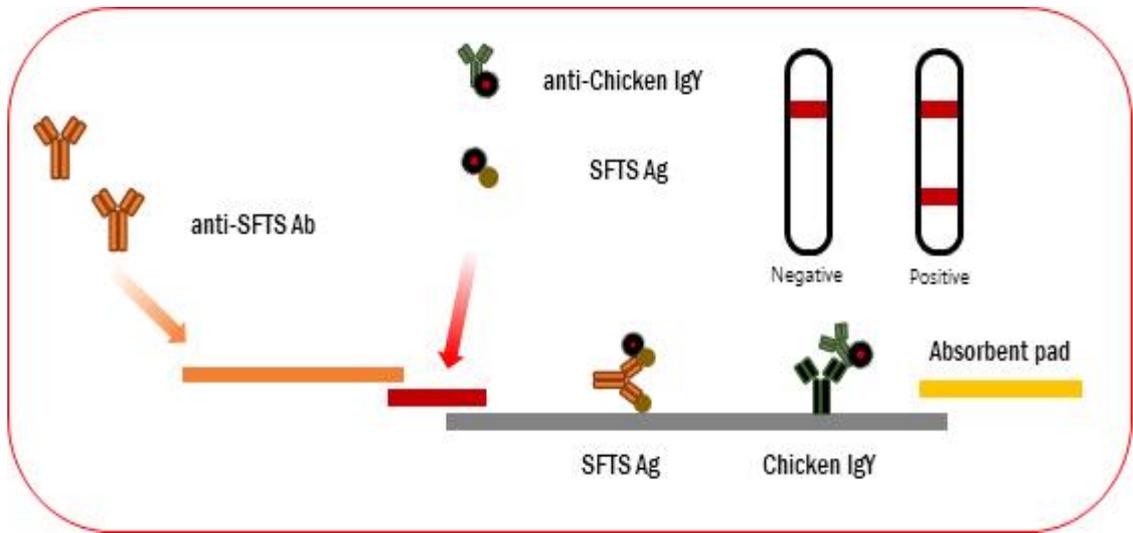


그림 34. 2line 최적화 모식도

		Au conjugate Ab 량 (μg)							
		5		10		15		20	
		N	P	N	P	N	P	N	P
라인분주 농도 (mg/mL)	0.5								
		+	++	+	+	+	++	+	+
	1								
		+	++	+	+	+	++	+	+++
	1.5								
		+	++	+	+	+	+	+	+++
	2								
		+	+	+	+	+	+++	+	++

그림 35. Au conjugate Ab 농도에 따른 최적화 테스트

- 실험 결과 Conjugation 및 라인분주 농도 조절만으로 비특이 반응이 제어되지 않음
- Conjugation 되는 Ag의 양이 많아지면 양성 표준물질에 대한 signal이 향상되고 비특이 반응은 영향 받지 않고 일정한 수준을 유지하는 경향성을 보임
- Blocker를 사용하여 비특이 반응을 제어할 수 있는지 확인하는 실험이 필요

		Sample pad 추가 blocker 종류											
		5% Skim milk		0.5% Casein		1% BSA		3% Glycine		1% PVP		0.4 mg/mL HIER-R-001	
		N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
<b>LINE</b> (mg/mL) <b>X</b> <b>GNP</b> ( $\mu$ g)	0.5 X 10												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
	1 X 5												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	+	++
	1 X 20												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	+	++

그림 36. 종류별 Blocker 테스트

- 20  $\mu$ g을 사용한 조건에서는 비특이 반응이 제어되는 경향성도 없고 제일 강한 비특이 반응이 보여 제외함
- 그 외에도 모든 조건에서 비특이 반응은 사라지지 않으나 HIER 계열과 skim milk 조합에서 가능성이 보임

		Sample pad 추가 blocker 종류											
		0.4 mg/mL HIER-M-009		0.4 mg/mL HIER-R-012		0.5% Gelatin		0.5% Casein		50 $\mu$ g TRU blocker		5% Goat serum	
		N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
<b>LINE</b> (mg/mL) <b>X</b> <b>GNP</b> ( $\mu$ g)	0.5 X 10												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
	1 X 5												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	+	++
	1 X 20												
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	+++	+	++

그림 37. Blocker 추가 테스트

		BoreDa Au							
		0.6 mg/mL		0.57 mg/mL		0.51 mg/mL		0.45 mg/mL	
		N	P	N	P	N	P	N	P
Line 분주	0.6 mg/mL ↓ 0.5 mg/mL								
	0.57 mg/mL ↓ 0.5 mg/mL								
	0.51 mg/mL ↓ 0.45 mg/mL								
	0.45 mg/mL ↓ 0.4 mg/mL								

그림 38. Ab 농도별 테스트

- 약한 양성 signal과 비특이 반응을 제외하고 0.6 mg/mL과 조합한 경우 높은 가능성을 보였음
- 본 조건 또한 BoreDa 사의 gold solution에서 BBI 사의 gold solution으로 변경하고 blocker를 추가하여 test 해볼 필요성이 있음
- 다만 분주된 농도 자체가 많이 낮은 편이라 이후 민감도 테스트 (LoD test)에서 탈락될 조건일 수 있음

		BoreDa Au SFTS Ag (Chosun) 0.6 mg/mL 10 µg 10X/anti-chicken IgY 10 µg 5X								
		Pooling 1	Pooling 2	Pooling 3	Pooling 4	Pooling 5	Single 1	Single 2	Single 3	
SFTS Ag (Chosun) 0.6 → 0.5 Chicken IgY 1 DAF-140UT	Skim + HIER									
		Single 4	Single 5	Single 6	Single 7	Single 8	Single 9	Single 10	Single 11	
		Single 12	Single 13	Single 14	Single 15	Single 16	Single 17	Single 18		

그림 39. 비특이 반응 테스트

- ΔF<sub>x</sub> Ag(Plant Ag)의 경우, pooling 검체 5개와 single 검체 18개 모두 비특이 반응이 확인되지 않았음
- 정제된 Ag의 경우에도 비특이 반응이 관찰되지 않았으나 민감도가 더 높을 것으로 예상되는 ΔF<sub>x</sub> Ag 조건으로 최종 선정을 진행하고자 함

#### 4) 검체 점적 방법 및 채취 도구 테스트 (LFA)

- ✓ 경우 1 - sample과 buffer를 나누어 두 곳에 점적
- ✓ 경우 2 - sample과 buffer를 순차적으로 한 곳에 점적

- 경우 1이 signal이 더 좋으나 housing 사출의 문제가 있어 경우 2로 선정함
- Inverted cup은 채취량이 일정치 않아 capillary tube로 선정함

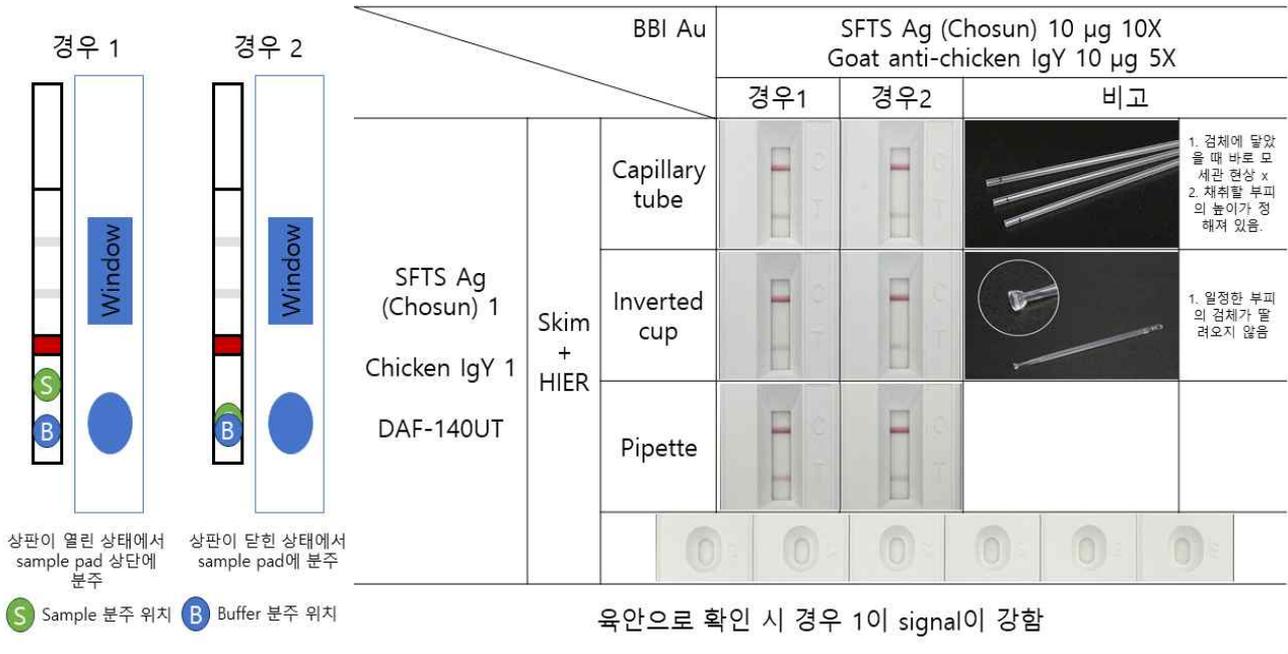


그림 40. 검체 점적 방법 및 채취 도구 테스트

#### 5) 포장 박스 제작 (LFA)

- ✓ 표시기재 사항에 맞추어 제작함
- ✓ 박스 당 10 tests 임



그림 41. 포장 박스 디자인

## 6) 분석적 성능평가 (LFA)

- ✓ 최종 선정된 조건으로 시제품을 제작하여 분석적 성능평가를 진행함
- ✓ 평가 항목별 상세 실험 결과는 별첨한 분석적 성능시험 보고서에 작성되어 있음
- ✓ 최소검출한계 (Limit of Detection)

단계	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
희석배수	1	2	4	8	16	32	64	128	256	-
반복횟수	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
양성 판정수	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0
양성 판정율 (%)	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0

- 원액의 표준물질을 64배 희석한 경우까지 육안으로 양성 판정이 가능함을 확인하였음
- 64배 희석 이하로 낮아진 농도의 시험물질은 위 시험방법으로 전개 시 육안으로 판별이 어려웠기 때문에 상기 시험물질의 최소검출한계는 64배 희석한 표준물질로 정하였음

### ✓ 판정기준치 (Cut-off value)

- BM Canine SFTS Ab Rapid Gold 제품은 육안으로 검사 결과를 확인하는 키트이므로 최소 검출한계 값이 판정기준치와 동일함
- 따라서 본 시험 제품의 판정기준치는 최소검출한계 값인 64배 희석 표준물질로 정하였음

### ✓ 교차반응

번호	교차반응 물질	Test 농도	BM-230927-A		
			반복횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)
1	PRRSV US	>10 <sup>5</sup> PFU/mL	3	0	0
2	PRRSV EU		3	0	0
3	EMCV		3	0	0
4	JEV		3	0	0
5	CSFV LOM		3	0	0
6	SIV H1N2		3	0	0
7	ADV		3	0	0
8	PPV		3	0	0
9	PCV2		3	0	0
10	TGEV		3	0	0

- 10가지 교차반응용 시험물질의 최대 농도값으로 3회 반복실험한 결과 BM Canine SFTS Ab Rapid Gold 제품의 교차반응은 확인되지 않았음

✓ 간섭반응

간섭 물질	Test 농도	음성 표준물질			음성 표준물질 + 간섭물질			저농도 표준물질			저농도 표준물질 + 간섭물질		
		반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)	반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)	반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)	반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)
Acetaminophen	10 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Acetylsalicylic acid	20 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Bilirubin	0.4 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
EDTA	0.2 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Hemoglobin	2 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Heparin	2 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Ibuprofen	5 mM	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Triglyceride Mix	20 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Canine whole blood	5% (v/v)	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Feline whole blood	5% (v/v)	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Ethanol	5%	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Ampicillin	1 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Ascorbic acid	40 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100
Prednisone	0.2 mg/mL	3	0	0	3	0	0	3	3	100	3	3	100

- 간섭 가능성이 있는 14가지 시험물질들을 각각 주어진 농도에서 음성과 양성 표준물질과 혼합하여 확인한 결과 테스트 농도 범위 안에서는 간섭 반응이 확인되지 않았음

✓ 반복성

날짜간		반복 일수	일별 시험 횟수	총 시험 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)	날짜간 일치율 (%)
음성		20	2	40	0	0	100
SFTS Ab	고농도	20	2	40	40	100	100
	중농도	20	2	40	40	100	100
	저농도	20	2	40	40	100	100

검사간		일별 시험 횟수	시험 횟수당 반복 횟수	총 시험 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)	검사간 일치율 (%)
음성		2	2	4	0	0	100
SFTS Ab	고농도	2	2	4	4	100	100
	중농도	2	2	4	4	100	100
	저농도	2	2	4	4	100	100

- 음성 및 양성 표준물질에 대한 20일간의 날짜간, 검사간 정밀도(반복성)에 문제가 없음을 확인하였음

✓ 재현성

- 장소에 따른 재현성

기초실험실			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

측정실			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

용액제조실			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

- 사람에 따른 재현성

연구원 1			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

연구원 2			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

연구원 3			음성	저농도	중농도	고농도
Day 1	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 2	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 3	오전	1	-	+	+	+

	오후	2	-	+	+	+
		1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 4	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
Day 5	오전	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+
	오후	1	-	+	+	+
		2	-	+	+	+

- 음성 및 양성 표준물질에 대한 5일 간의 정밀도(재현성)에 문제가 없음을 확인하였다.

✓ 사용기한 설정

Lot. BM-230927-A			음성	SFTS Ab		
				저농도	중농도	고농도
Day	0 (9/27)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	1 (9/28)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	2 (9/29)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	5 (10/2)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	8 (10/5)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	12 (10/9)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	14 (10/11)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
21	1회	음성	양성	양성	양성	

	(10/18)	2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	28 (10/25)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	35 (11/1)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	49 (11/15)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성
	70 (12/6)	1회	음성	양성	양성	양성
		2회	음성	양성	양성	양성
		3회	음성	양성	양성	양성

- BM Canine SFTS Ab Rapid Gold 키트를 이용한 검사 시 55℃ 가속노화조건에서 70일까지 안정된 결과가 나타난 것을 확인하였음
- 다음의 계산식에 따라 55℃ 가속노화조건에서 약 64일이면 상온 조건으로 12개월과 동등하다고 인정됨

$$AAF = Q_{10}^{[(T_{AA}-T_{RT})/10]} \quad (1)$$

$T_{AA}$  ≡ 가속노화온도 (°C)

$T_{RT}$  ≡ 주변 온도 (°C)

$$AAF = 2^{[(55-30)/10]} = 5.66$$

가속노화시간(AAT)=설정된 (RT)/AAF

$$AAT = \text{설정된 (RT)}/5.66 \Rightarrow \text{설정된 (RT)} = 63.6\text{일} \approx \text{약 70일}$$

- 따라서 BM Canine SFTS Ab Rapid Gold의 유효기간은 상온에서 12개월로 설정하였음

### 7) 임상적 성능평가 (LFA)

- ✓ 농림축산검역본부에서 발간한 동물용 체외진단시약의 성능 및 안정성시험 가이드라인 (2019.01)에 근거하여 동물의 혈액 검체를 대상으로 시험기기 'BM Canine SFTS Ab Rapid Gold'의 SFTS Ab에 대한 임상적 성능을 시험하였음

Sample No.	BM-230927-A			Sample No.	BM-230927-A		
	반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)		반복 횟수	양성 판정수	양성 판정율 (%)
BM01-R001	1	0	0	BM01-R016	1	0	0
BM01-R002	1	1	100	BM01-R017	1	1	100
BM01-R003	1	0	0	BM01-R018	1	0	0

BM01-R004	1	0	0	BM01-R019	1	1	100
BM01-R005	1	0	0	BM01-R020	1	0	0
BM01-R006	1	1	100	BM01-R021	1	1	100
BM01-R007	1	0	0	BM01-R022	1	1	100
BM01-R008	1	0	0	BM01-R023	1	0	0
BM01-R009	1	1	100	BM01-R024	1	0	0
BM01-R010	1	1	100	BM01-R025	1	0	0
BM01-R011	1	1	100	BM01-R026	1	0	0
BM01-R012	1	0	0	BM01-R027	1	0	0
BM01-R013	1	0	0	BM01-R028	1	0	0
BM01-R014	1	1	100	BM01-R029	1	0	0
BM01-R015	1	0	0	BM01-R030	1	0	0

시험검사법	확인검사법		
	양성	음성	합계
양성	10	0	10
음성	0	20	20
합계	10	20	30

$$\text{임상적 민감도} = 10 / (10+0) \times 100(\%) = 100.0\%$$

(95% 신뢰구간 0.6915 - 1.0000)

$$\text{임상적 특이도} = 20 / (0+20) \times 100(\%) = 100.0\%$$

(95% 신뢰구간 0.8316 - 1.0000)

$$\text{양성예측도} = 10 / (10+0) \times 100(\%) = 100.0\%$$

(95% 신뢰구간 0.6915 - 1.0000)

$$\text{음성예측도} = 20 / (0+20) \times 100(\%) = 100.0\%$$

(95% 신뢰구간 0.8316 - 1.0000)

- 1차 유효성 평가는 항 SFTS virus 항체에 대한 임상적 민감도, 임상적 특이도를 기준으로 평가하였음

- 평가 결과 임상적 민감도 100.0%(95% 신뢰구간 0.6915 - 1.0000)와 특이도 100.0%(95% 신뢰구간 0.8316 - 1.0000)를 확인하였고, 양성예측도는 100% (95% 신뢰구간 0.6915 - 1.0000), 음성예측도 100.0% (95% 신뢰구간 0.8316 - 1.0000)의 결과가 나왔음

### 8) 실험체 표준물질 C-ECL 테스트

- ✓ ELISA를 통해 검증된 실험체 표준물질을 사용하여 항원 쌍 민감도 테스트 진행
- 연구 기간 중 조선대학교 측에서 개발된 SFTS indirect ELISA protocol로 역가를 확인, 해당 항체 표준물질을 이용하여 항원 쌍의 민감도를 확인함
- 조선대학교에서 개발된 NP 단백질과 시중에서 구매할 수 있는 NP 단백질의 분석능을 비교함

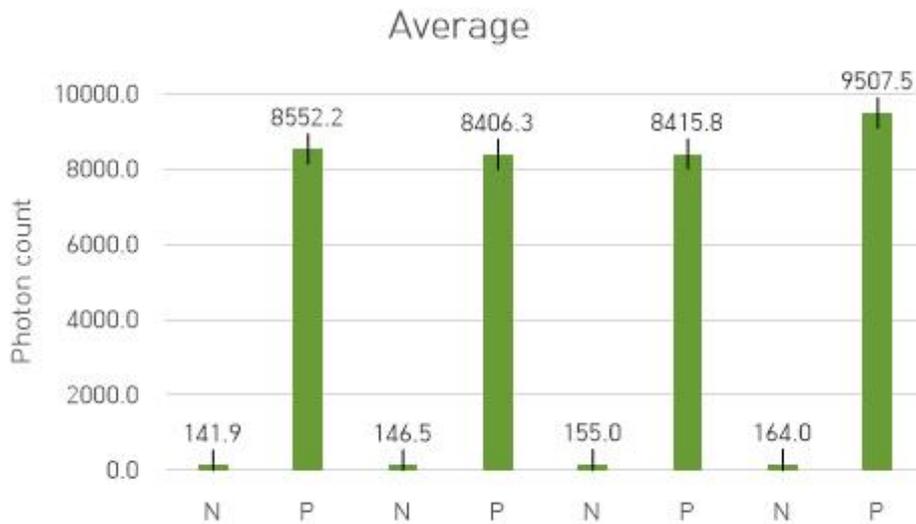


그림 42. 실검체 표준물질 C-ECL 테스트

Detector	SFTS Ag (Chosun) - Tb				SFTS Ag (BoreDa) - Tb			
	N	P	N	P	N	P	N	P
Wafer	SFTS Ag (Chosun)		SFTS Ag (BoreDa)		SFTS Ag (Chosun)		SFTS Ag (BoreDa)	
1	144.38	8722.62	156.57	8435.10	150.96	9379.14	148.64	9940.49
2	141.67	8630.18	139.36	8126.97	146.46	8074.16	146.63	9434.25
3	139.75	8303.94	143.68	8656.95	167.54	7794.04	196.87	9147.81
Average	141.9	8552.2	146.5	8406.3	155.0	8415.8	164.0	9507.5
STDEV	2.3	220.0	9.0	266.2	11.1	846.0	28.4	401.4
%CV	1.6	2.6	6.1	3.2	7.2	10.1	17.3	4.2
S/N	1.0	60.3	1.0	57.4	1.0	54.3	1.0	58.0

- 4가지 조합 모두 양·음성이 구분되어 관찰됨을 확인하였음
- 다만 구매한 단백질의 경우 일부 테스트로 인해 CV 값이 흔들리고 이로 인해 S/N 값은 조선대학교에서 개발한 항원 쌍을 사용하였을 때 가장 좋음을 확인함

### 9) C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화

- ✓ 기존 고정화 방식과 함께 EDC/NHS coupling 방법 비교
- 1차년도 결과, EDC/NHS를 사용하는 방법이 S/N가 향상된 것을 확인하였음. 이에 본 조건에 APTES를 추가하여 단백질이 고정되기 용이하게 함

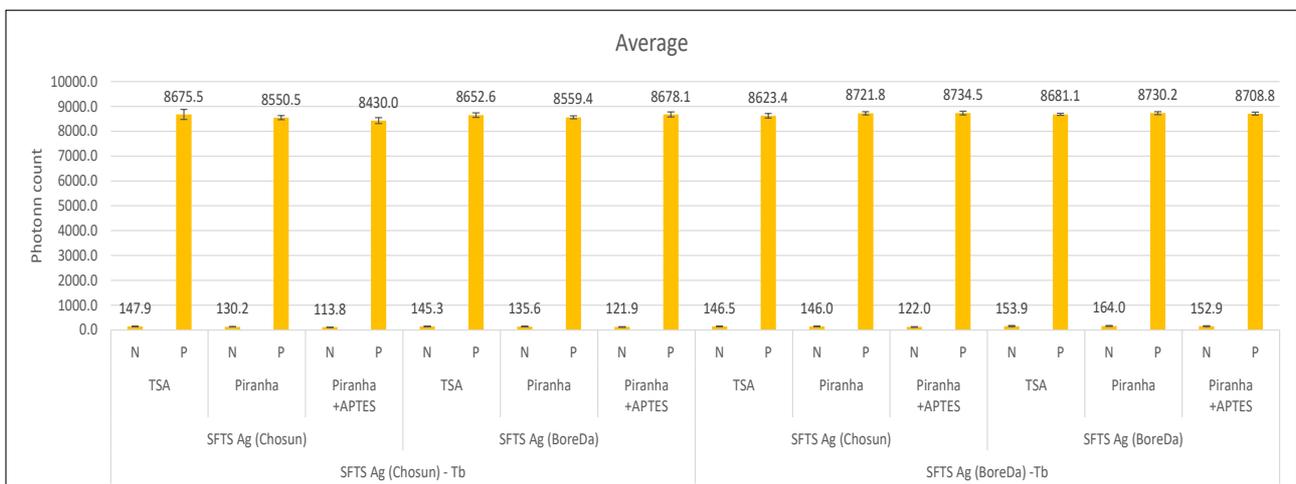


그림 43. 고정화 방법 최적화

- 대부분의 경우 TSA < Piranha < Piranha+APTES 순으로 S/N가 상승하는 것을 확인함
- 그중 조선대에서 제공한 항원 쌍을 이용하여 piranha+APTES 방식을 활용한 경우가 가장 유효한 결과를 보였음. 따라서 해당 조건을 최적화된 조건으로 정함

### 10) 음성 실험체 비특이 반응 확인

- ✓ 선정된 최적화 항원 쌍 조건에서 음성 검체를 사용해 특이도를 확인
- 단일 검체 5개씩 pooling한 검체 5개와 단일 검체 18개 (총 23개 검체)를 이용하여 진행했으며 모든 검체에 대하여 음성의 결과를 확인함

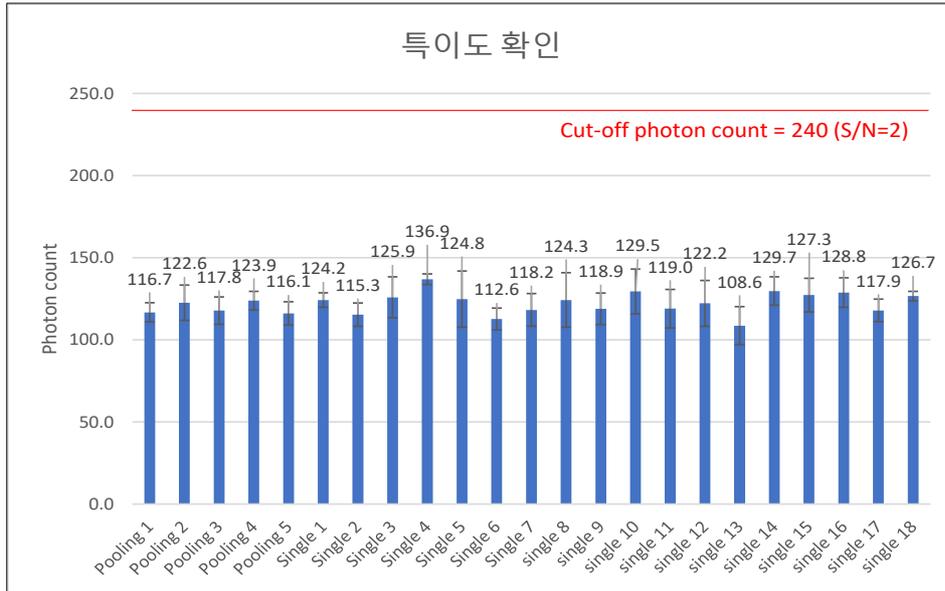


그림 44. 실험체 비특이 반응 테스트

### 11) 분석적 성능평가 (C-ECL)

- ✓ 최소 검출한계 평가
- indirect ELISA로 양성 표준물질의 최소 검출한계는 저농도-3단계까지 확인하였으나 ECL에서는 저농도-6단계까지 양성으로 판단하였음

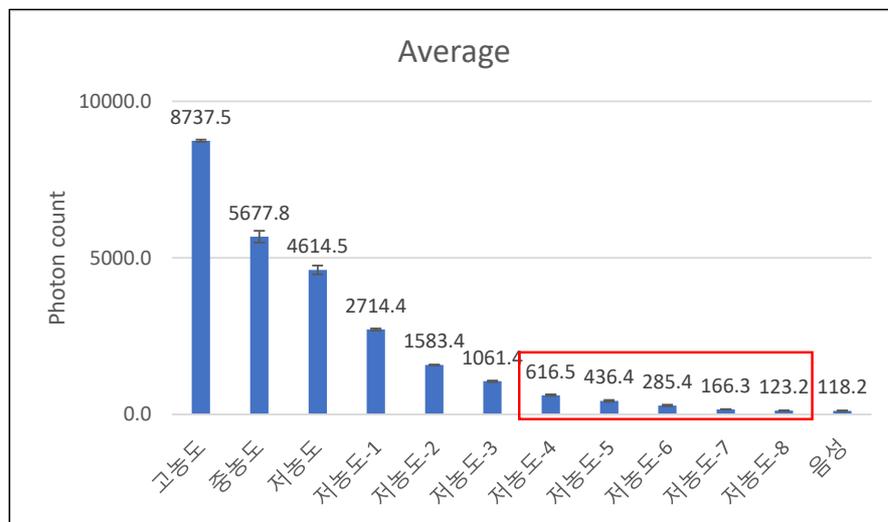


그림 45. 최소검출한계 테스트

- 저농도-6단계를 기준으로 상하 2단계씩 추가하여 추가 민감도를 5일간 21회씩 총 105회 확인하였을 때 저농도-4~6단계는 양성으로, 저농도-7~8단계는 음성으로 확인되었음

✓ 교차 반응 평가

- 임의의 병원균에 의한 위양성 결과가 발생하는지 확인하기 위하여 교차 반응 평가를 진행하였음

- 음성 표준물질에 교차 물질을 추가하여 테스트한 결과, 교차 물질의 영향 없이 표준물질에 따른 결과를 확인하였음

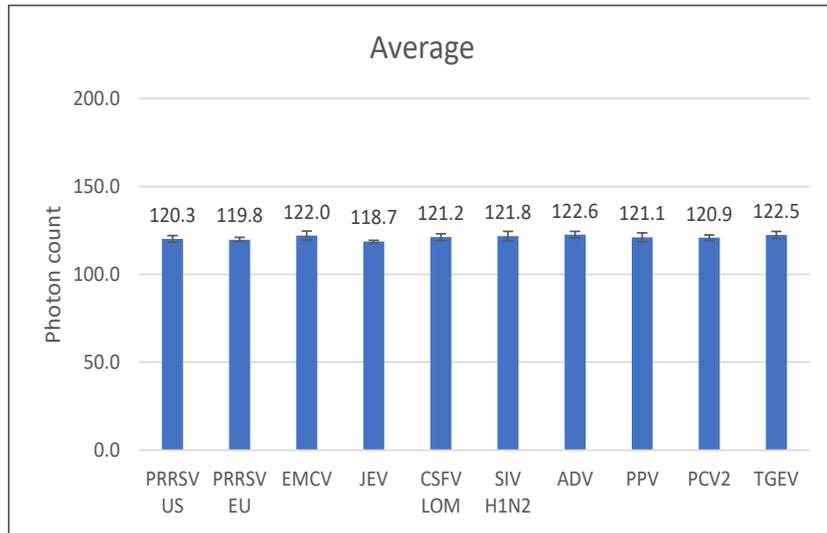


그림 46. 교차 반응 테스트

✓ 간섭 반응 평가

- 임의의 간섭 물질에 의하여 음성 혹은 양성 결과가 영향받는지 알아보기 위하여 간섭 반응 평가를 진행함

- 음성 표준물질에 저농도 표준물질과 각 표준물질에 간섭 물질(총 14개)을 추가하여 테스트한 결과 간섭 물질의 영향 없이 표준물질에 따른 결과를 확인하였음

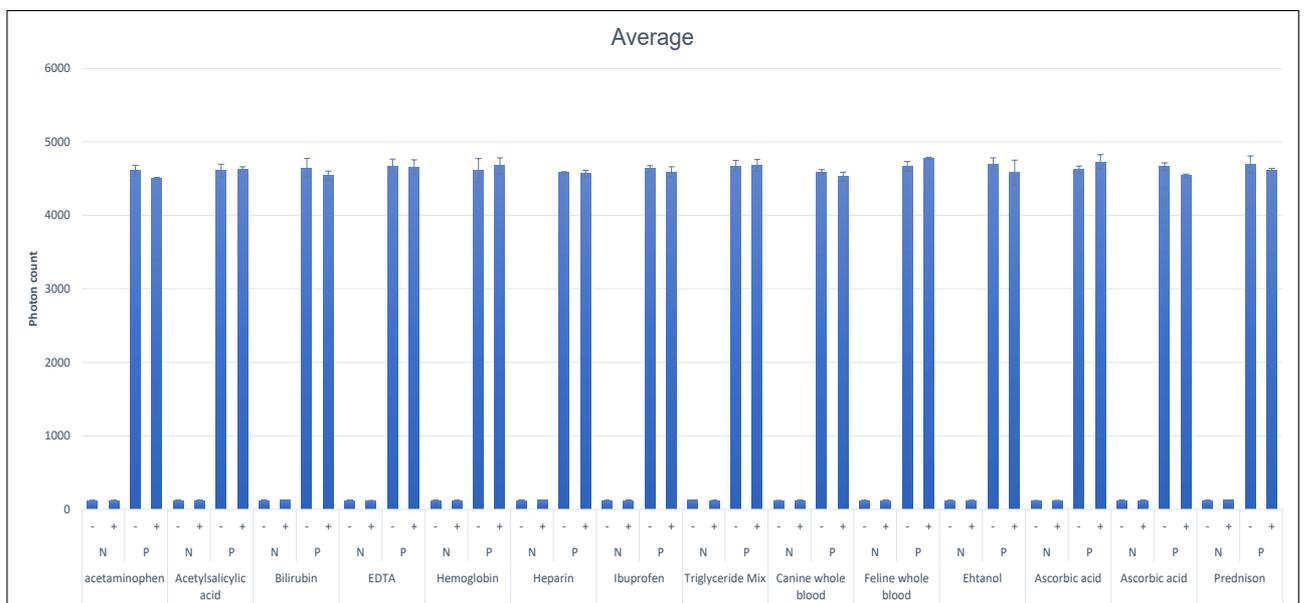


그림 47. 간섭 반응 테스트

✓ 반복성 평가

- 수일간의 실험을 진행하여도 테스트 간 편차 없이 민감도가 유지되는지 확인하기 위하여 반복성 평가를 진행함
- 20일 동안 1일 2회, 2반복 결과 모든 표준물질의 결과가 일치함을 확인함

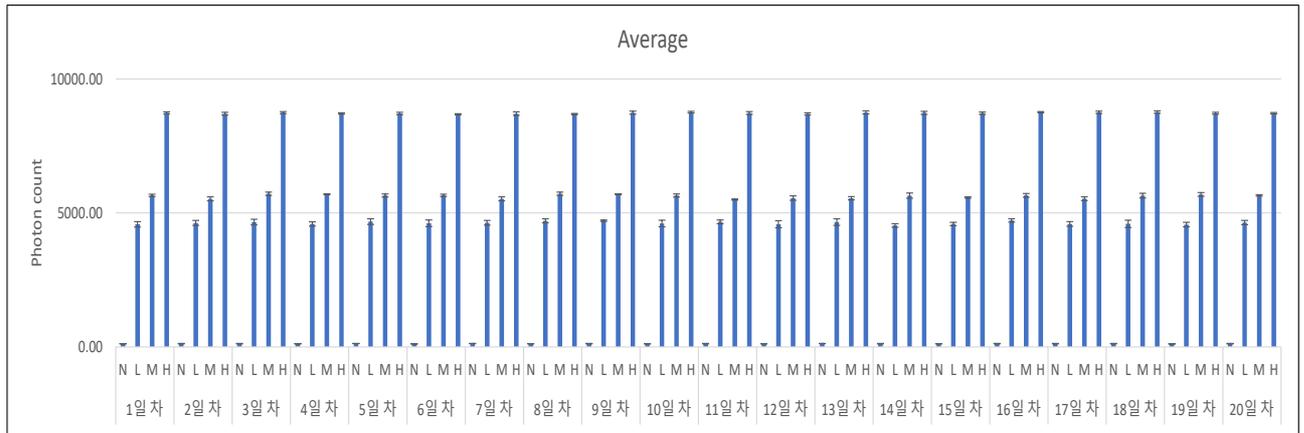


그림 48. 반복성 평가 테스트

✓ 재현성 평가

- 여러 장소에서 다수의 연구자가 수일간의 실험을 진행하여도 테스트 간 편차 없이 민감도가 유지되는지 확인하기 위하여 재현성 평가를 진행함
- 총 3곳의 장소에서 5일 동안 1일 2회, 2반복 결과 모든 표준물질의 결과가 일치함을 확인함



그림 49. 장소별 재현성 평가

- 총 3명의 연구자가 5일 동안 1일 2회, 2반복 결과 모든 표준물질의 결과가 일치함을 확인함

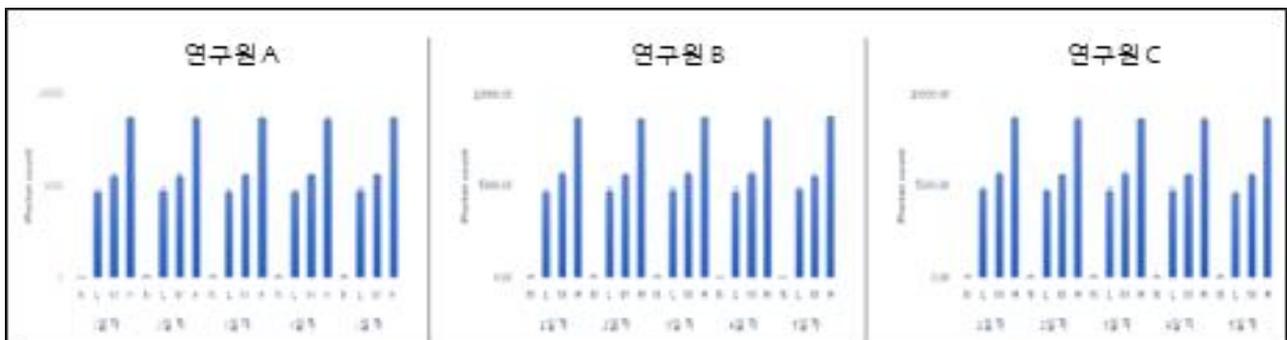


그림 50 실험자별 재현성 평가

✓ 사용기한 설정

- 상온 보관을 기준으로 70일간 55°C 가속노화 테스트 (약 12개월 보관 테스트)
- 음성, 고농도, 중농도, 저농도 표준물질을 임의의 일자로 1일 2회, 2반복 측정

$$AAF = Q_{10}^{[(T_{AA}-T_{RT})/10]} \quad (1)$$

$T_{AA}$  ≡ 가속노화온도 (°C)

$T_{RT}$  ≡ 주변 온도 (°C)

$$AAF = 2^{[(55-30)/10]} = 5.66$$

가속노화시간(AAT)=설정된 (RT)/AAF

$$AAT = \text{설정된 (RT)}/5.66 \Rightarrow \text{설정된 (RT)} = 63.6\text{일} \approx \text{약 70일}$$

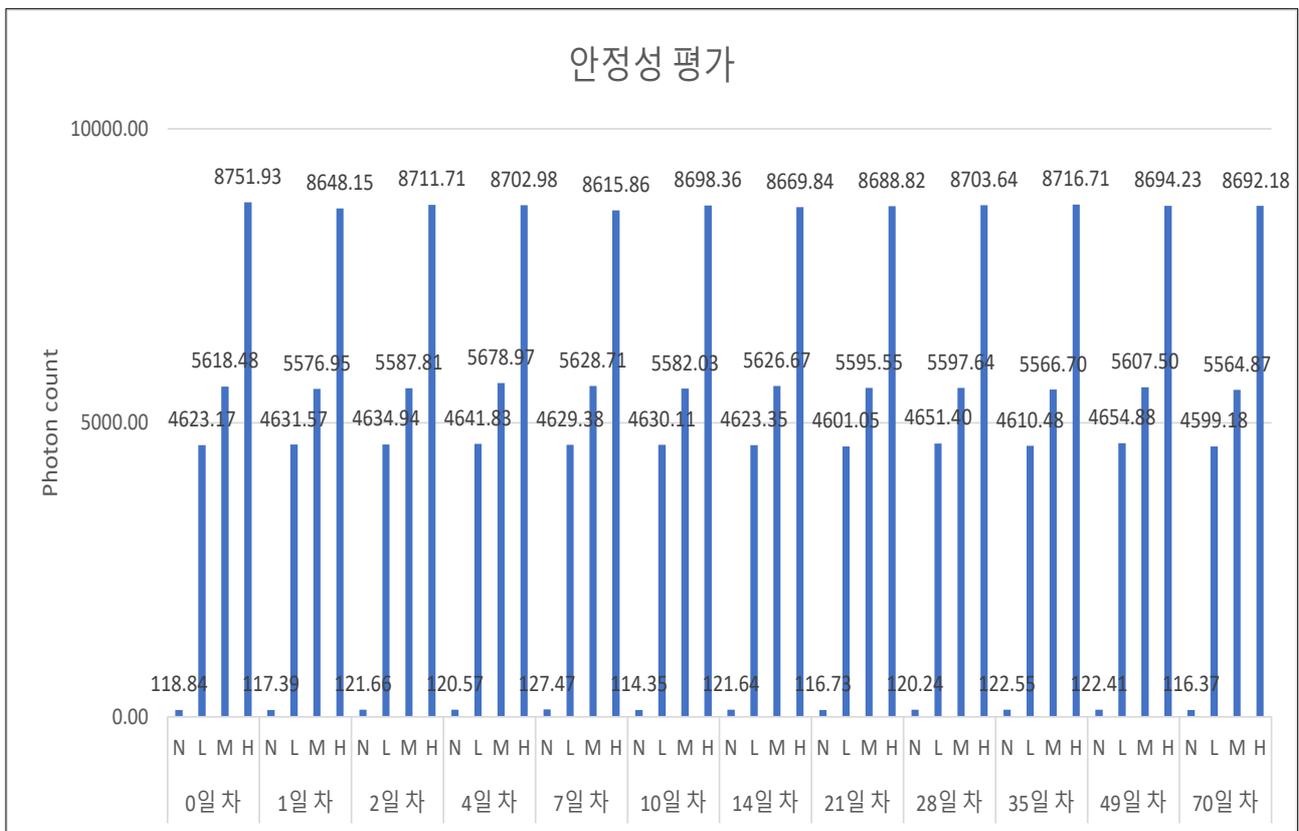


그림 51. 안정성 평가

- 70일까지 가속 노화하여 확인한 결과, 제조 당일 테스트한 결과값과 비교하여 큰 차이가 보이지 않으므로 약 12개월간 키트가 상온에서 유효하다고 판단함

12) 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용 - 최적 발광물질 선정 및 최적화 테스트

- ✓ Ru(Ruthenium)에 대한 SiPM C-ECL 감도 테스트 및 감도 향상 조건 확립
- 최적의 바이오마커 발광물질의 선정을 위해 Ru에 대한 SiPM에서의 C-ECL 감도 테스트를 진행함. 감도 향상을 위해 기존 Cassette washing 버퍼인 Borate 버퍼에서 1X PBS 버퍼로 변경 및 공반응물로  $K_2S_2O_8$ 로 변경하여 최적화를 진행함. 변경된 조건 하에서 Ru 농도 별 C-ECL intensity 조사 및 Calibration curve를 통한 선형성 테스트를 진행함.

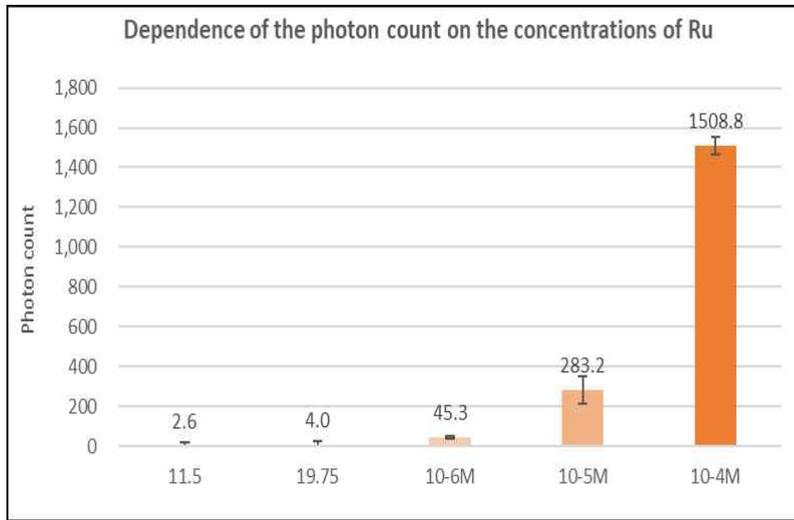


그림 52. SiPM에서 측정된 Ru의 C-ECL intensity

- 테스트 결과, Ru 농도에 따라 농도 의존적으로 신호가 증가되는 결과를 얻을 수 있었으며, Calibration curve를 통한 선형성 테스트 진행 결과, SiPM 조건 하에서 Ru 농도 대비 선형적으로 photon count가 검출됨을 확인하였으며 해당 발광물질을 이용하여 정량 분석이 가능할 것으로 판단됨

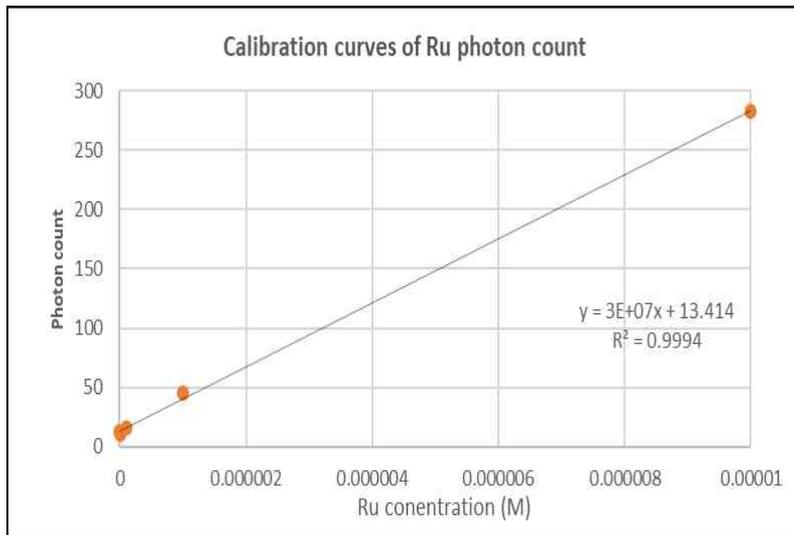


그림 53. SiPM에서 측정된 Ru의 C-ECL Calibration curve

- ✓ Eu(Europium)에 대한 감도 테스트 및 감도 향상 조건 확립
- 최적의 바이오마커 발광물질의 선정을 위해 Eu에 대한 SiPM에서의 C-ECL 감도 테스트를 진행함. 감도 향상을 위해 기존 Cassette washing 버퍼의 공반응물을  $K_2S_2O_8$ 로 변경하여 최적화를 진행함. 변경된 조건 하에서 Eu 농도 별 C-ECL intensity 조사 및 Calibration curve를 통한 선형성 테스트를 진행함

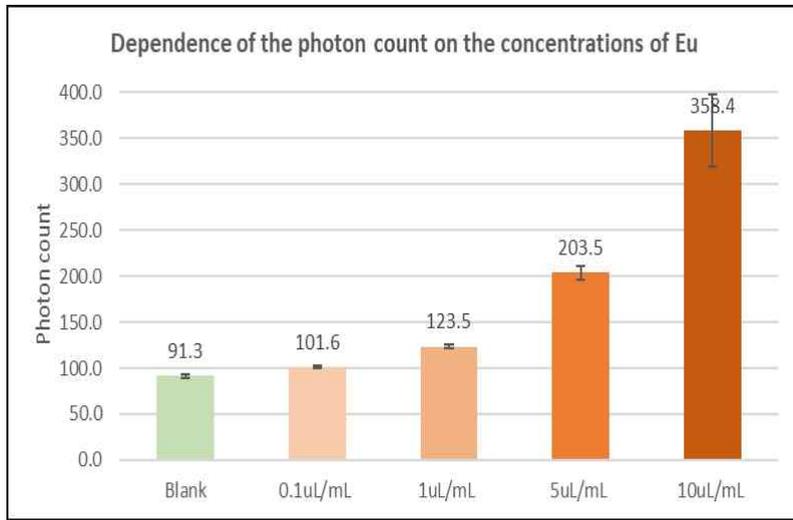


그림 54. SiPM에서 측정한 Eu의 C-ECL intensity

- 테스트 결과, Eu 농도에 따라 농도 의존적으로 신호가 증가되는 결과를 얻을 수 있었으며, Calibration curve를 통한 선형성 테스트 진행 결과, SiPM 조건 하에서 Eu 농도 대비 선형적으로 photon count가 검출됨을 확인하였으며 해당 발광물질을 이용하여 정량 분석이 가능할 것으로 판단됨

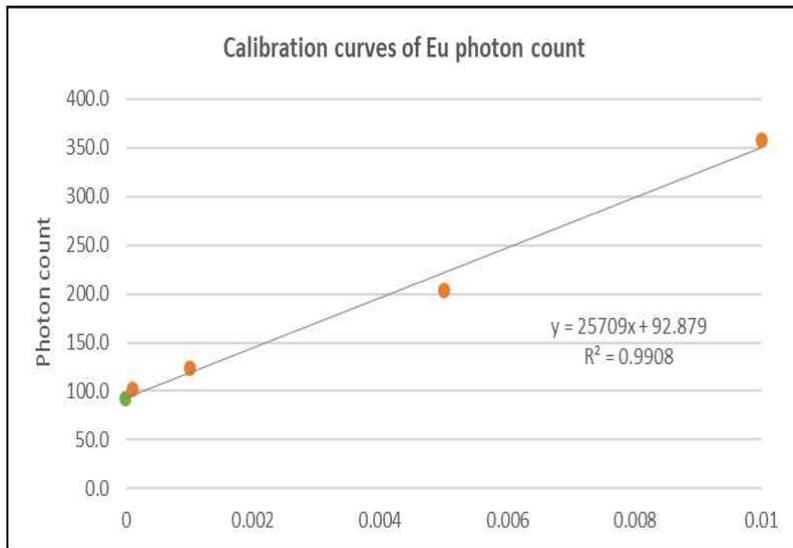


그림 55. SiPM에서 측정한 Eu의 C-ECL Calibration curve

✓ Tb(Terbium)에 대한 감도 테스트 및 Ru와 Eu와의 감도 비교를 통한 최종 바이오마커 발광물질 선정

- 최적의 바이오마커 발광물질의 선정을 위해 Tb에 대한 SiPM에서의 C-ECL 감도 테스트를 진행함. Cassette washing 버퍼로 Borate 버퍼와 공반응물로는  $\text{NaN}_3$ 를 사용하였으며, 해당 조건 하에서 Tb 농도 별 C-ECL intensity 조사 및 Calibration curve를 통한 선형성 테스트를 진행함

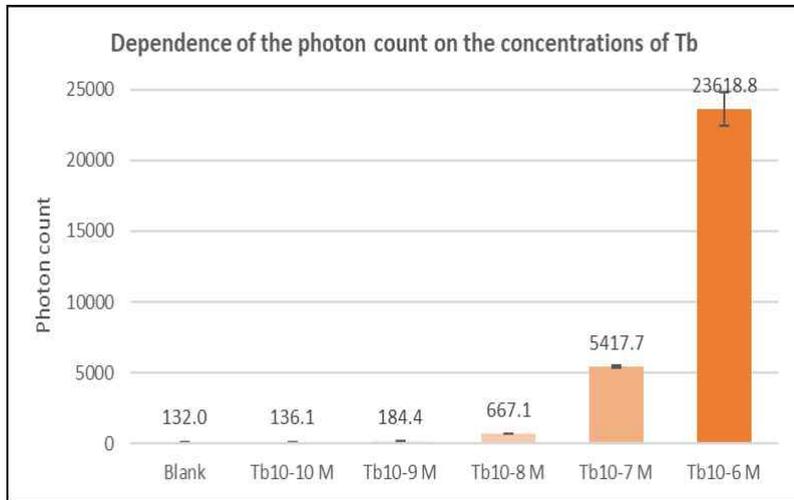


그림 56. SiPM에서 측정된 Tb의 C-ECL intensity

- 테스트 결과, Tb 농도에 따라 농도 의존적으로 신호가 증가되는 결과를 얻을 수 있었으며, Calibration curve를 통한 선형성 테스트 진행 결과, SiPM 조건 하에서 Tb 농도 대비 선형적으로 photon count가 검출됨을 확인하였으며 앞서 테스트한 Ru와 Eu, Tb의 농도 대비 검출되는 photon count를 확인할 때, Tb에서 가장 높은 감도를 보여 최종 바이오마커 발광물질로 Tb를 선정함.

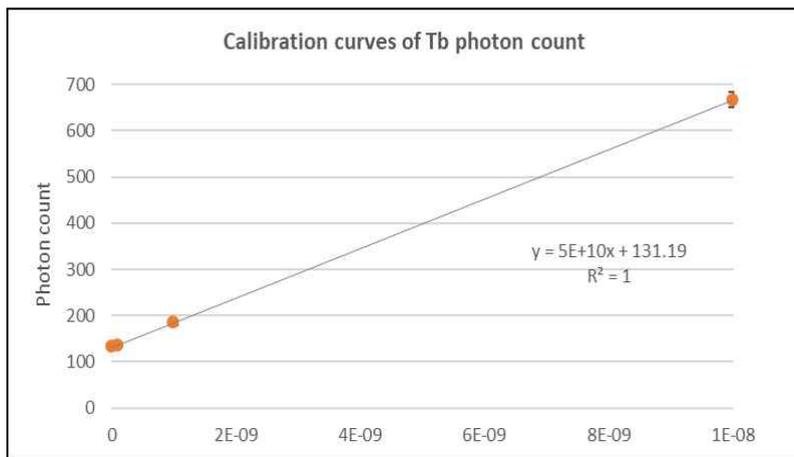


그림 57. SiPM에서 측정된 Tb의 C-ECL Calibration curve

### 13) 카트리지 및 전용 장비 목업 준비 - 카트리지 구조 최적화 및 기기 호환 테스트

✓ 카트리지 구조 최적화 및 기기 호환 테스트

- 카트리지 구조 최적화를 위해 FPCB의 WE(Working electrode) 면적 및 WE와 RE(Reference electrode) 간의 간격을 조절하여 C-ECL cell 구조 최적화를 진행함.



그림 58. RE, CE(Counter electrode) FPCB. 좌 No.1, 우 No.2.

- 변경된 FPCB가 포함된 카트리지를 이용하여 Ag의 농도 별 C-ECL intensity 조사 및 Calibration curve를 통해 감도 테스트를 진행함.

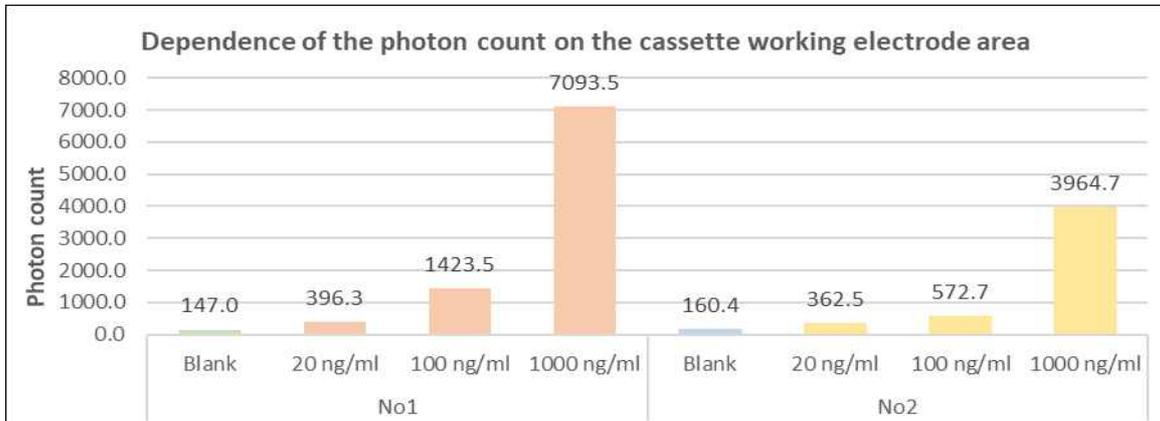


그림 59. No.1, No.2 FPCB를 포함한 카트리지를 이용한 Ag 농도에 대한 C-ECL intensity

- 테스트 결과, Ag 농도에 따라 농도 의존적으로 신호가 증가되는 결과를 얻을 수 있었으며, Calibration curve를 도시한 결과, SiPM 기기 조건하에서 Ag의 농도 대비 선형적으로 photon count가 검출됨을 확인할 수 있었으며, 동일한 파라미터(parameter) 조건 하에서 No.1 FPCB를 포함한 카트리지의 경우에서 더 높은 감도를 보여 No.1 FPCB를 선정하여 카트리지를 제작, 적용함

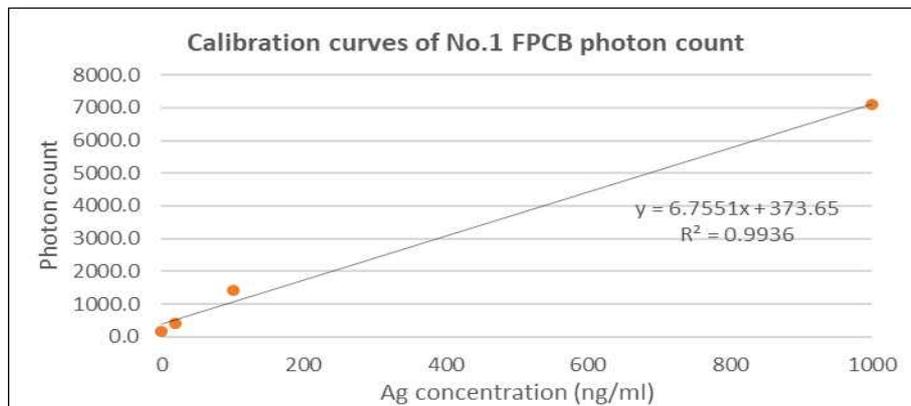


그림 60. No.1 FPCB를 포함한 카트리지의 Ag 농도 변화에 대한 C-ECL Calibration curve

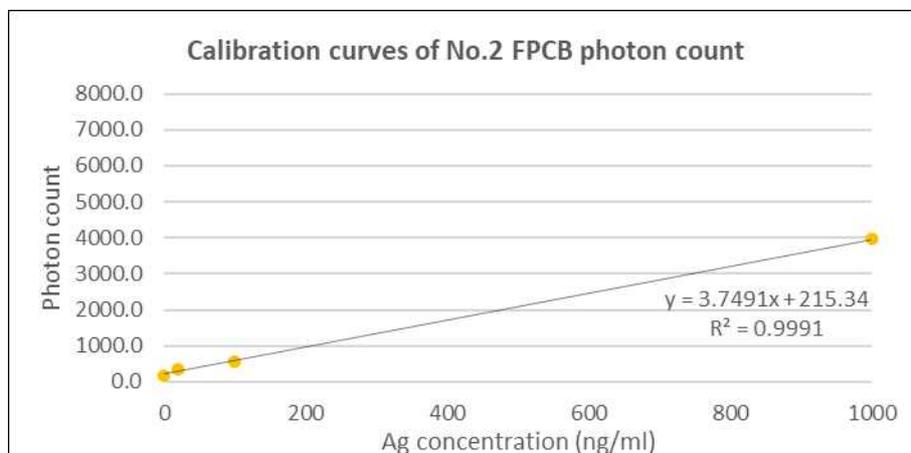


그림 61. No.2 FPCB를 포함한 카트리지의 Ag 농도 변화에 대한 C-ECL Calibration curve

#### 14) 카트리지 안정성 테스트 - 정밀성 테스트 및 보완

✓ Tb의 SiPM 동작 파라미터 최적화

- SiPM에서의 Tb의 시간당 방출 photon count를 조사하여 분석 알고리즘을 작성하고 측정 시간 조건 최적화를 진행함.

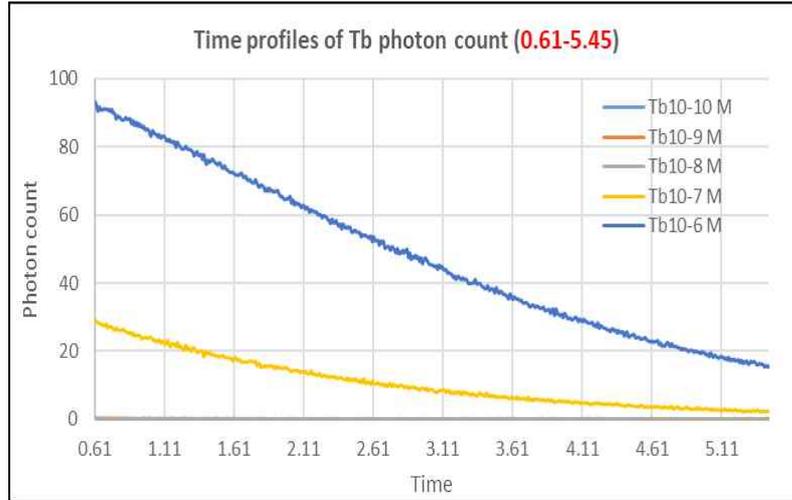


그림 62. SiPM에서의 Tb의 시간당 방출 photon count

- 측정 시간 및 각 농도에 대한 방출 시간을 고려할 때, 0.6 μs에서 5.45 μs까지의 시간 동안 photon count를 수집하도록 최적화를 진행함.

- 앞서 최적화된 알고리즘을 토대로 SiPM 측정 파라미터인 Release time 변경 테스트를 진행, Release time 변경 테스트 결과 5000 μs 동안 photon count를 수집했을 때 가장 높은 S/N값이 도출됨을 확인함.

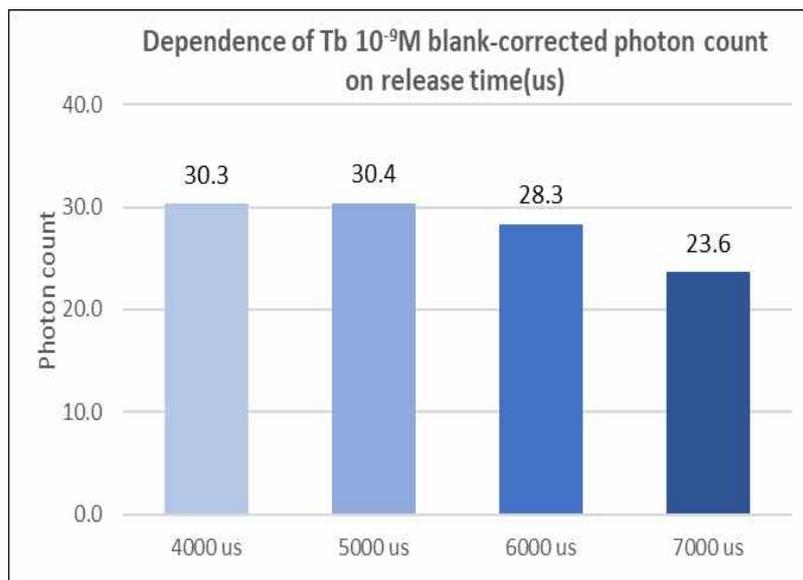


그림 63. Release time 변경에 대한 Tb의 방출 photon count

- SiPM 측정 파라미터인 Excitation current 변경 테스트를 진행, No.1 FPCB를 이용하였을 때의 WE 면적 대비 8 mA-10 mA의 current를 부여할 때 가장 높은 S/N값이 도출됨을 확인하였으나, WE에 로딩되는 고정화 물질 및 Ab를 고려하여 10 mA로 최적화를 진행함

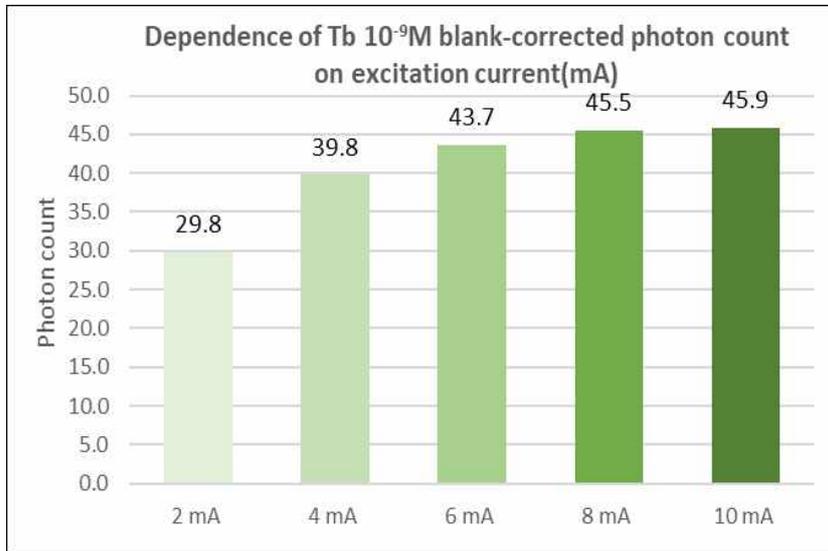


그림 64. Excitation current 변경에 대한 Tb의 방출 photon count

### 15) SiPM ECL Analyzer 시제품 설계 및 제작

- ✓ 휴대 및 실험실 사용이 가능한 형태의 ECL Analyzer 설계
- 단일 바이오마커의 분석이 가능한 단일 SiPM 센서모듈의 적용
- 현장에서 사용이 가능한 hand-held 형태의 제품 설계
- 외부 디스플레이와 배터리를 추가하여 사용 편의성 확보
- 센서 모듈에서 발생하는 열을 효과적으로 배출하기 위한 방열구조 설계

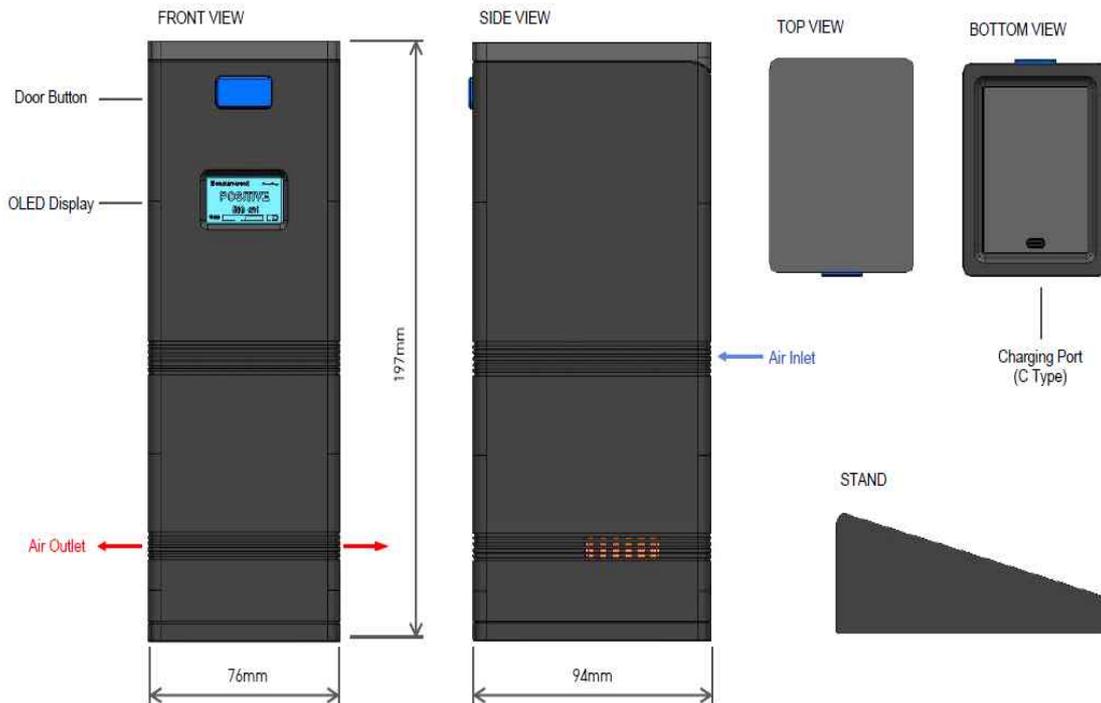


그림 65. ECL Analyzer Design Specification I

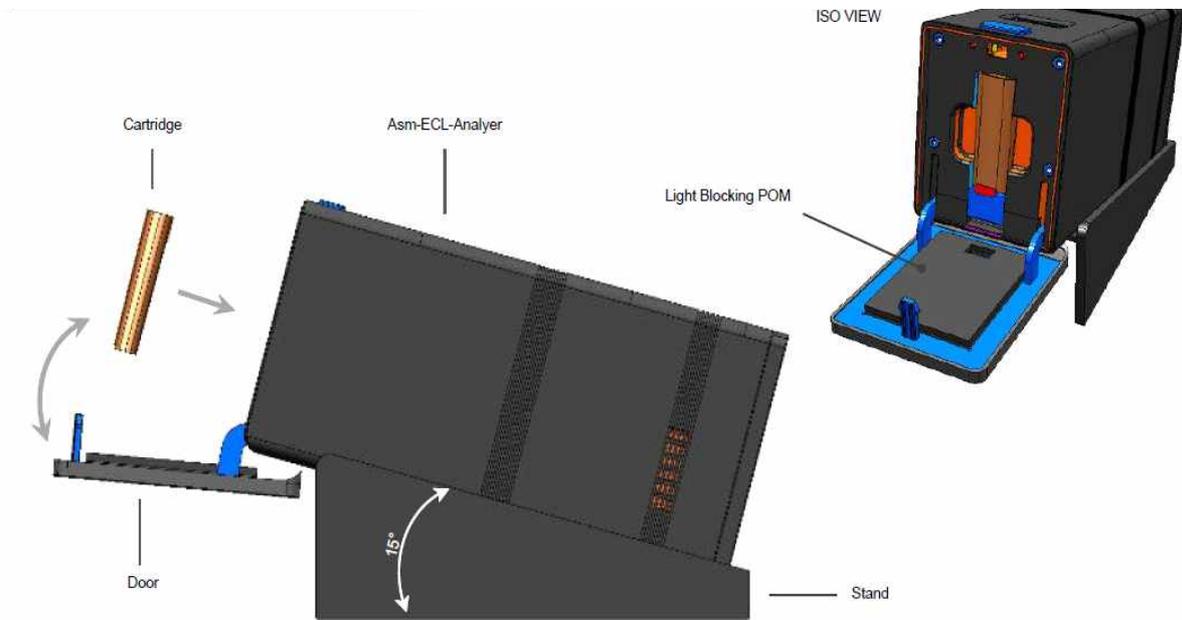


그림 66. ECL Analyzer Design Specification II

✓ 설계 변경 및 최적화

- 카트리지 장착을 위한 트레이의 내구성 확보 및 사용편의성 증가를 위한 댐핑기어 추가
- Analyzer 사용 방향을 고려한 디스플레이 장착방향 변경
- 미끄러짐 방지와 사용성 확보를 위한 스탠드 틸팅 각도 수정 및 요철 추가

▶ 도어 오픈시 스므스하게 내려가도록 댐핑기어 추가.

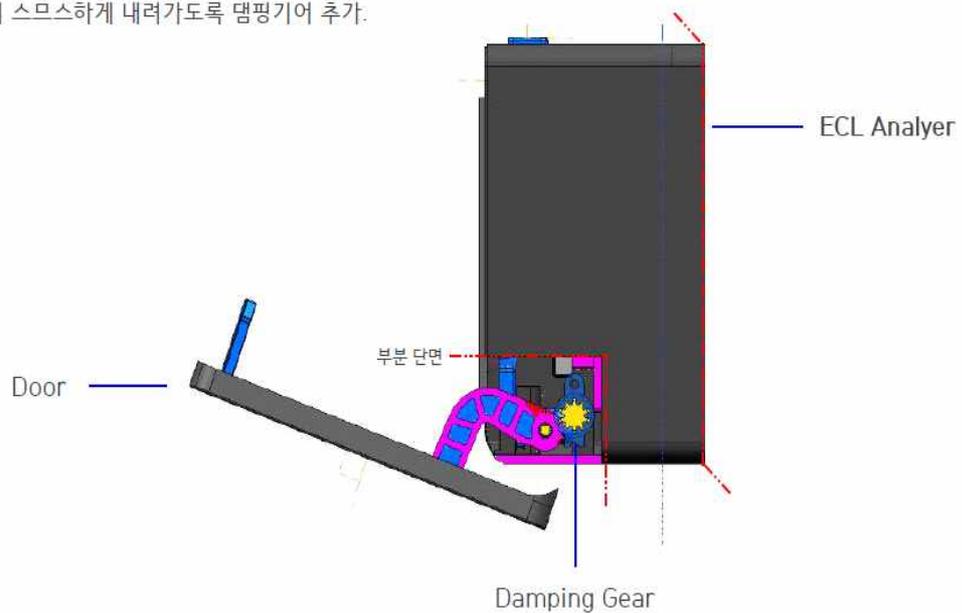


그림 67. ECL Analyzer 설계변경 내용 I

▶ Display 180도 회전

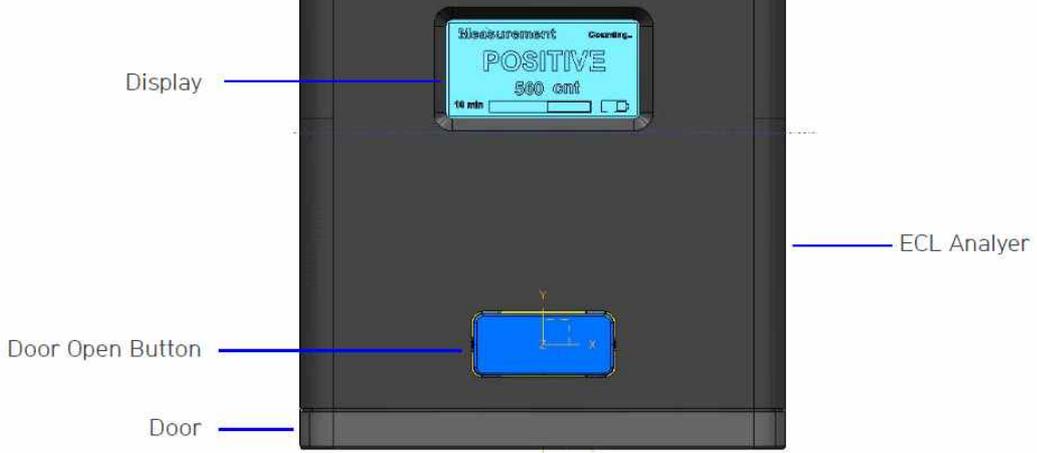


그림 68. ECL Analyzer 설계변경 내용 II

- ▶ 아래의 그림과 같이 스탠드와 분석기에 돌기 와 홈을 추가 하여 분석기 미끄러짐 방지
- ▶ 마그네트를 추가하여 추가적인 미끄럼방지와 좌우로 넘어짐 방지
- ▶ 기울기를 5도로 수정.

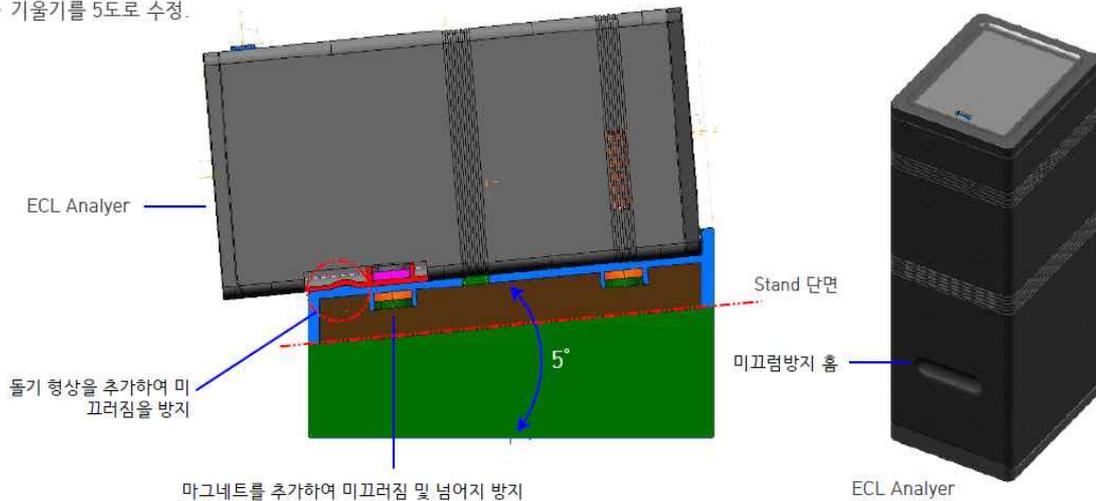


그림 69. ECL Analyzer 설계변경 내용 III

✓ 시제품 제작

- 3D 프린팅 및 CNC 가공을 통해 analyzer 하우징 및 부품 제작
- PCB, SiPM, Battery 등을 추가하여 시제품 완성



그림 70. ECL Analyzer 시제품 외관 I



그림 71. ECL Analyzer 시제품 외관 II

❖ 공동연구개발기관 - ㈜윙틀

<1차년도>

1) NC (nitrocellulose) 멤브레인의 백킹(backing)기술 개발

- ✓ NC 멤브레인의 PET 부착형(backed type)과 미부착형(non backed type)이 있으며 그 중 윙틀에서 개발하고 있는 부분은 부착형으로 필름(PET)와 멤브레인의 상호 부착성이 맞아야 함. 뿐만아니라 PET 필름을 기재로 사용하는 모든 제품은 PET 필름과의 상용성이 좋아야하는데, 그 중 윙틀에서 개발하고있는 NC 멤브레인도 PET와 함께 제품화(제품개발) 시 PET 필름(백킹 기술)의 선택도 중요함
- ✓ PET 자체의 미세 표면 구조와 그로 인한 접착성은 멤브레인 제조 공정에서 매우 주요한 역할을 함. 그 예로 NC/PES멤브레인 제조 공정에 따라 서로 다른 PET 필름을 사용하여야 하며, 필름 선택을 잘못하였을 경우 제조과정 중 멤브레인이 필름에서 탈착되어 공정이 중단되는 경우가 발생하기도 함
- ✓ PET필름은 우수한 물리적 특성, 화학적 특성 및 치수 안정성, 투명성, 재활용성 등을 가지고 있으며, 무엇보다 제조하고자 하는 멤브레인과 호환성이 좋아야함
- ✓ PET 제조사의 제품군으로는 코로나, 양면 우레탄, 아크릴, 실리콘, 슬립 PET 가 있으며, 각각 코팅물질(배합액)에 따라 상용성이 나오는 제품을 사용해야 하는데, 먼저는 코로나 페트가 제일 상용성이 많고, 많은 제품에 사용하여 제일 먼저 도입을 하였음.
- ✓ 단면 corona RX600 : corona 전처리를 가한 PET 필름으로써, corona 표면처리란 두 개의 전극 사이에 고전압을 흘려 보내 발생된 고주파 또는 저주파에 의해 방전전극과 처리기재 사이에 있는 공기를 이온화 하여 전하를 띤 입자를 발생시키고 이러한 입자들이 제품 표면을 형질변화 시킴으로써 멤브레인이 제품에 완전 밀착 될 수 있는 여건을 만들어주는 처리방법을 말함. 코로나 표면처리는 단지 표면에서만 발생하므로, 강도 또는 외관과 같은 원소재의 특성에는 영향을 주지 않으며, 친수성 향상 및 접착성 향상 등의 효과를 얻을 수 있음

	단면 corona PET	양면 우레탄 PET	Slip PET
제조사	효성	SKC	SKC
제품명	RX600	V7610	SH71S
사진			

그림 72. 멤브레인 배킹 필름

- ✓ 양면 우레탄 V7610 : 양면 우레탄 코팅 필름으로는 PET 양면에 우레탄 액을 코팅하여 열경화 한 제품으로 사용 물질(코팅 물질)에 따라 우수한 접착성을 가지며 가격이 매우 싸다는 장점이 있음
- ✓ Slip PET SH71S : 최종적으로 사용하고 있는 PET 필름으로써, 높은 투명도, 내열/내한성, 기체 비투과성, 내화학성이 뛰어나고 무엇보다 윙틀에서 생산하고 있는 NC멤브레인과의 접착성이 우수함

- ✓ 여러 가지 PET 백킹 필름을 제조 공정에 시험하여 현 움틀 NC멤브레인 제조 용액 배합 및 공정과의 사용성이 가장 뛰어난 백킹 필름을 선택함

## 2) LFA용 NC 멤브레인 상용화, 대량생산 기술 개발

- ✓ 현재 움틀의 NC 멤브레인 생산은 VIPS (vapor induced phase inversion, 비용매 유도 상전이)-NIPS (nonsolvent-induced phase inversion, 증기 유도 상전이) 공정을 통해 이루어지고 있으며, 이 공정은 용액 배합 후 slot die machine에서 분사되어 가습챔버 (VIPS), 워터배스(NIPS), 건조챔버를 통과하면서 멤브레인의 구조가 만들어지는 방법을 채택하고 있음

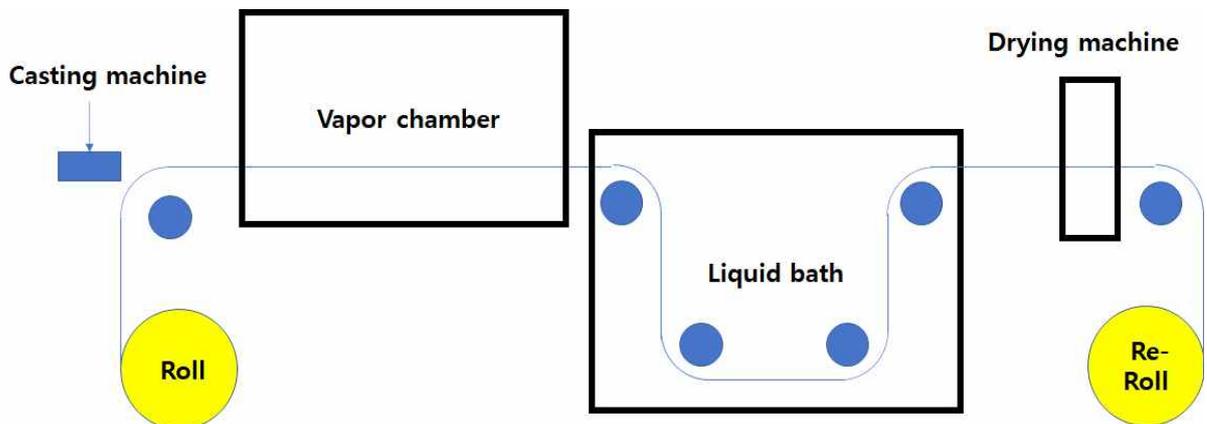


그림 73. 멤브레인 제조 공정도

- ✓ 안정적이고 고품질의 멤브레인 대량생산 기술 개발을 위해 NC멤브레인을 만드는 공정 자체의 물리적 조건(PET 필름 변경, 토출량, 가습 세기, 배기량, 온도 등)을 변경하거나 NC 멤브레인 제조 용액의 배합(NC, 고형물, 계면활성제, 이 외 첨가제 등)을 변경하여 데이터를 축적함
- ✓ 선진사 진단키트용 멤브레인 품질을 따라잡기 위해 여러 가지 조건에서 실험을 진행함
- ✓ (NC 점도 변경) NC 제조 용액의 점도를 특정하는 RS의 수치를 변경함으로써, RS80을 이용한 멤브레인의 경우 선진사(S사)와 유사한 수준의 표면 구조 형성이 가능함을 확인함
- ✓ (물 함량 변화) 물 함량 변화에 따른 멤브레인의 pore형성을 SEM을 통해 관찰한 결과 물의 함량을 늘릴수록 pore 구조가 늘어남을 확인함.
- ✓ 특히 NC 5wt% 조건에서 물의 함량이 증가하면 액이 불안정해지지만, 표면 구조가 개선되며 적정량의 물 함량 10.5wt%에서 표면구조가 가장 좋은 것을 확인함
- ✓ 물 함량 10.5wt%에서 wicking이 31mm에서 41mm/140s로 개선되어 선진사 기준과 비슷한 수준에 도달함. 그러나 물의 함량이 늘어난 만큼 분주 라인은 불균형하며 발색은 흐려지게 되어 SDS dip 혹은 발색을 진하게 하는 첨가제를 사용하여 개선할 예정임
- ✓ (CA 첨가량) CA첨가량을 늘리며 멤브레인을 제조하여 분석해본 결과, 첨가량이 증가할수록 표면 pore 구조가 증가하는 것으로 보임
- ✓ CA는 첨가량이 늘어날수록 표면에 pore 형성에 도움을 주어 pore를 열어주며, SDS와 함께 작용하여 SDS양이 많아 질수록 pore 크기를 증가시켜 열린 pore 구조의 틀을 잡아주는 역할로 예상됨

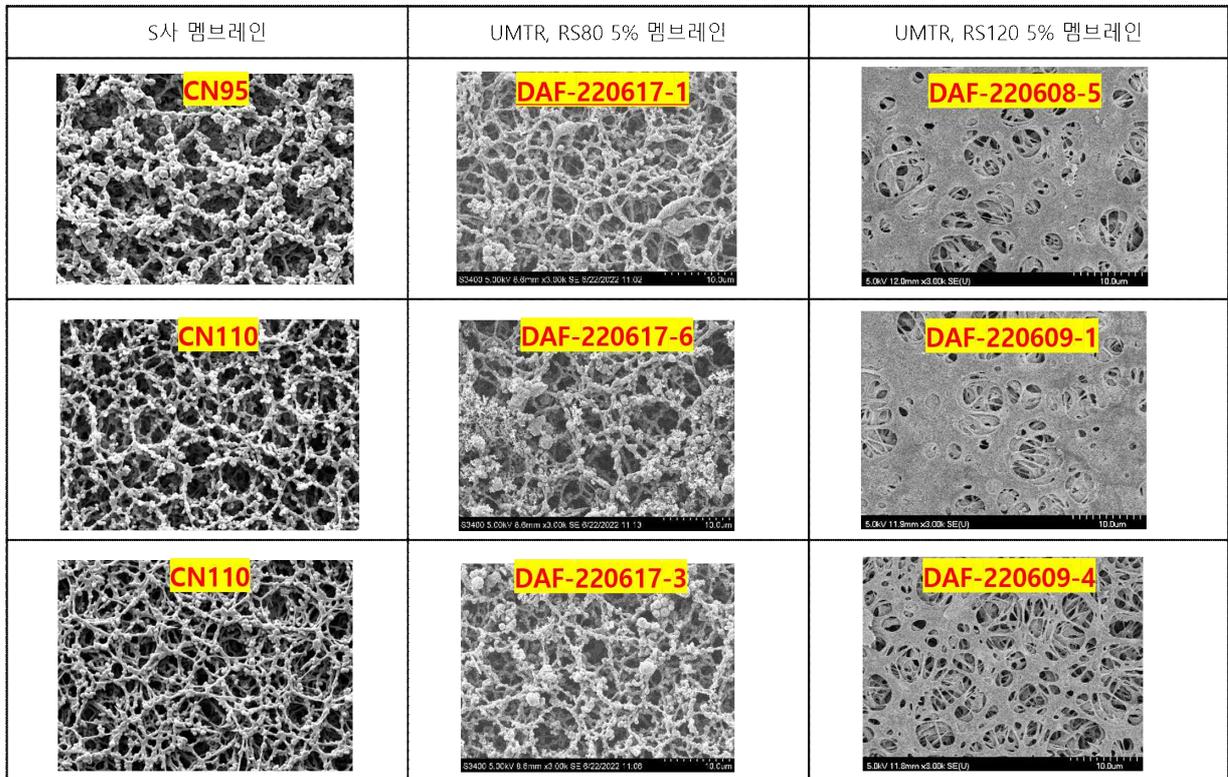


그림 74. (주)움틀 RS80 멤브레인파 선진사 멤브레인 pore 비교(SEM)

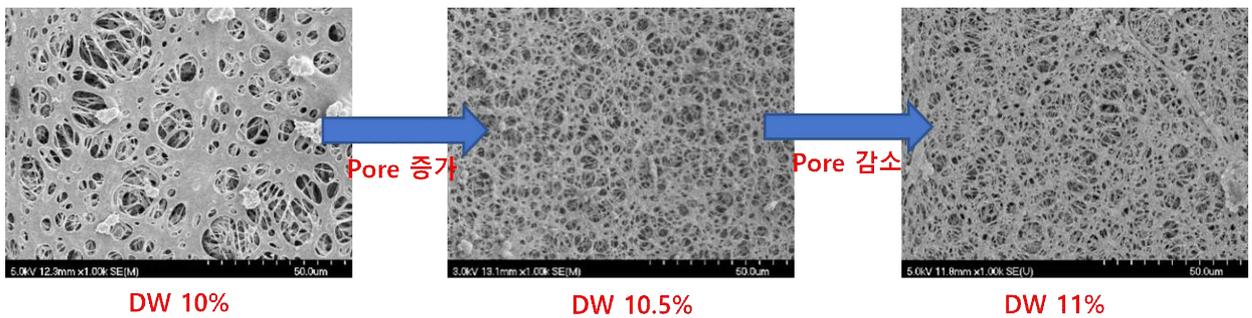


그림 75. 물 함량 변화에 따른 pore형성의 변화(SEM)

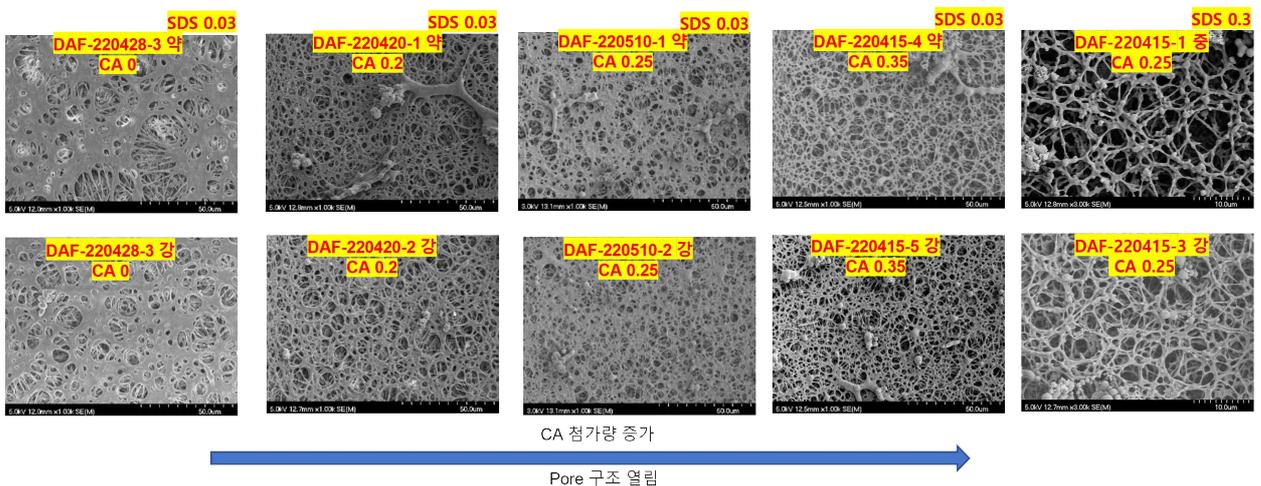
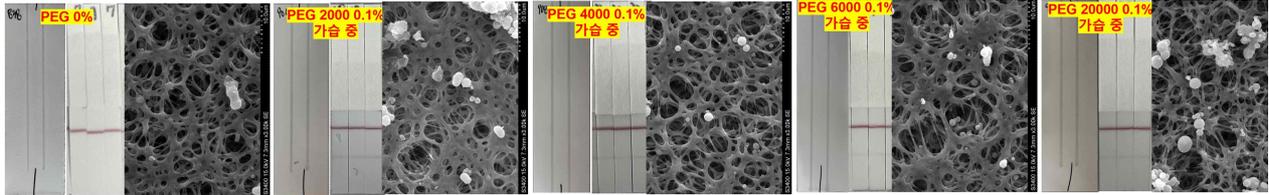


그림 76. CA 첨가량 증가에 따른 pore형성 변화(SEM)

- ✓ (PEG 첨가량) 다른 계면활성제인 PEG를 첨가하여 멤브레인에 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 하였으며, 분자량에 따라 PEG 2000~20000까지 범위에서 lab test를 진행함

- ✓ Lab scale에서는 PEG를 첨가함으로써 분주와 발색라인이 선명해지고, PEG 6000의 경우 wicking이 40mm/140s 이상으로 측정 됨
- ✓ PEG 6000 함량을 1.5%까지 높이면서 멤브레인 형성을 분석한 결과 표면 구조에는 큰 영향을 끼치지 않으나 0.75%까지 분주 라인이 균일, 선명해지는 것을 확인하여 pilot 공정에 도입함



	점도	두께	wicking
PEG 0%	838	98	37
PEG 2000 0.1%	903	100	32
PEG 4000 0.1%	963	111	35
PEG 6000 0.1%	857	112	44
PEG 20000 0.1%	780	107	33

그림 77. PEG 분자량 별 멤브레인 형성 분석 결과(SEM)

- ✓ PEG 6000 함량을 0.1%, 0.5%로 하여 pilot을 진행한 결과, PEG 6000 0.5% 조건의 전개 속도가 높게 측정되며 점도가 높아 두께를 높게 형성할 수 있음을 확인함
- ✓ 표면 구조상의 차이는 보이지 않으며, PEG 0.5%가 발색 라인이 더 진하게 나타나는 것으로 lab 실험과 유사한 결과를 얻어냄
- ✓ 결과적으로 PEG를 기존 NC 용액에 첨가함으로써 발색 라인이 선명해지고, wicking이 증가하는 것을 확인하였고, lab scale과 pilot간의 오차가 있지만 그 경향성이 일치하는 것으로 보임
- ✓ PEG 6000의 경우가 wicking, 발색 라인과 관련해서 좋은 효과를 나타내고 이는 곧 PEG가 발색 세기에 영향을 준다는 것을 시사하므로 함량 변경 및 다른 분자량의 PEG를 이용한 추가 연구가 필요하다고 생각하여 계획중임

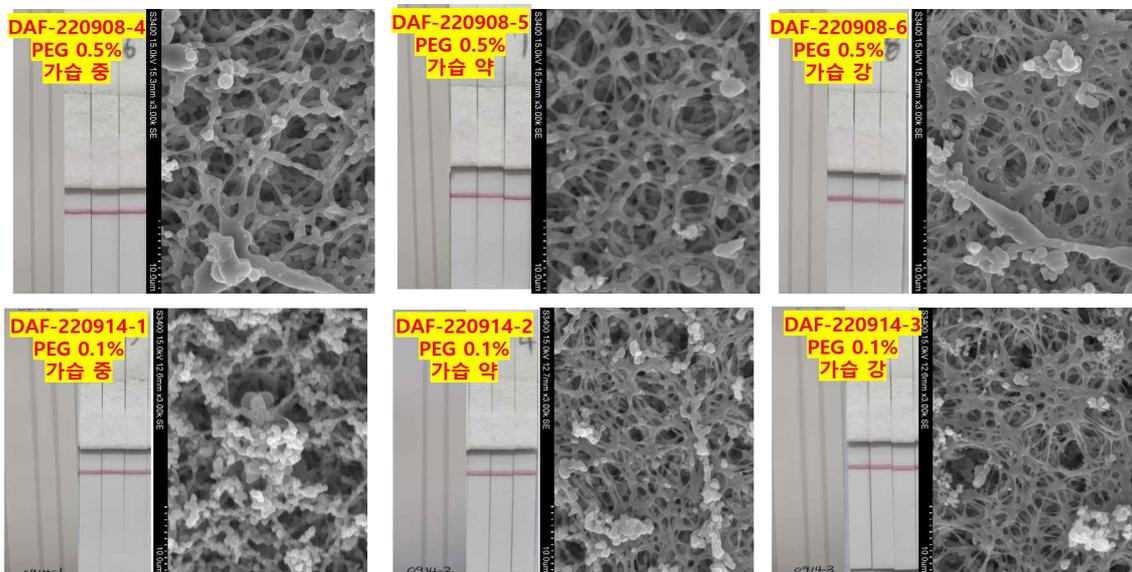


그림 78. PEG 6000 함량 별 멤브레인 형성 pilot결과(SEM)

- ✓ (DAF110 개발) 40 mm를 전개하는데 110초 ( $\pm 25$ 초)를 만족하는 값을 갖는 멤브레인을 코팅하기 위한 실험
- ✓ 과제 개발 목표인 전개속도 110초 기준 25초 내외에 해당하는 pilot 생산품들을 확보함
- ✓ NC멤브레인 용액 배합에 들어가는 NC 및 고흡분, 물, CA, SDS, Tween 20, caster oil, 그리고 Alcohol : MA와 IPA : MA 비율 등을 조절하며 pilot을 진행한 결과 전개속도 110초 범위에 충분히 들어가는 recipe들을 확보함
- ✓ Wicking 측정값 50mm 이상의 항목들은 전개 속도 110초 오차범위 기준에 충분히 부합하는 결과이며, 번짐이 없고 두께 및 pore size, 그리고 발색이 선진사와 비슷한 결과 데이터를 보유하고 있음
- ✓ 전개 속도에 있어 재연성 테스트 및 멤브레인으로써 가장 완성된 수준의 제품을 만들기 위해 반복적인 pilot test를 시행하여 검증할 예정임

샘플	Wicking rate (s)	발색 거동
1	108	
2	108	
3	105	
4	100	
5	90	

그림 79. 전개속도 110(오차범위 25)를 만족하는 pilot결과

## <2차년도>

### o NC 멤브레인 품질 향상을 위한 배합 조건 최적화 진행

- (SDS dip coating을 통한 성능 개선) SDS를 0.1wt%, 0.05wt%, 0.01wt%의 농도로 dip coating을 진행하였으며, 0.1% 농도에서는 균일한 분주라인이 형성되었지만 분주 라인이 번지는 현상이 나타났으며, 발색 수치가 낮게 측정되었음. 0.05wt% 농도의 경우 이전 농도 보다는 발색 수치가 향상되었지만, 타사 제품과 비교했을 때 성능이 낮게 나옴
- 0.01wt% 농도로 진행했을 때 가장 균일한 분주 라인을 형성하였으며, 타사 제품과 동등 혹은 그 이상의 성능을 나타내었으며, 기존 상용화된 제품을 대체할만한 수준의 성능을 보여주었음

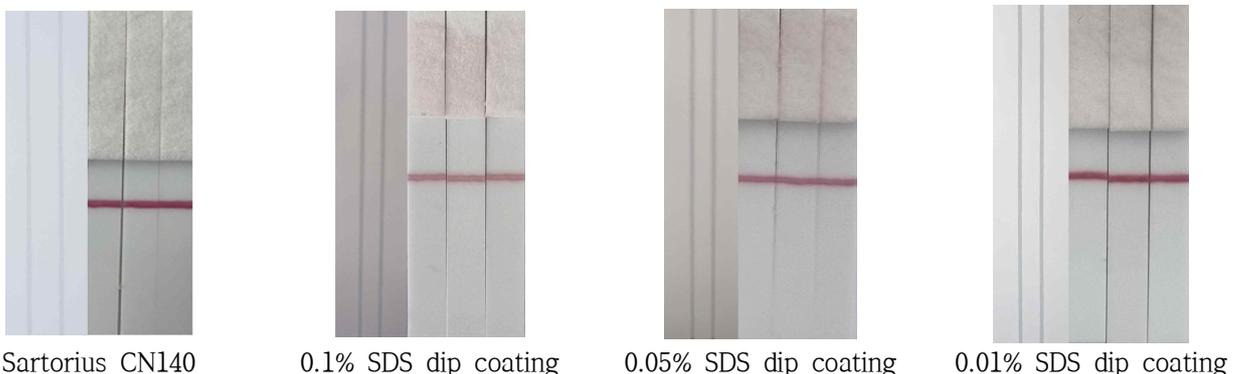


그림 80. 타사 제품과 비교

- (조성물 비율 변화에 따른 성능 개선) IPA : EtOH 의 비율이 1:1일때와 1:2.5 일 때 품질 개선이 나타났으며, 이 중 IPA : EtOH를 1:1의 비율로 첨가했을 때 분주라인이 가장 안정적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음



IPA:EtOH 1:1



IPA:EtOH 1:2.5

그림 81. IPA와 EtOH가 1:1일 때 분주라인이 개선됨을 확인

- Alcohol : MA 비율 변화에 따른 분주라인 개선 결과 1:1의 비율에서 분주라인도 안정적으로 나왔으며, 발색 정도 또한 우수함을 나타냈으며, SEM 이미지를 통해 균일한 기공사이즈를 갖고 있음을 확인하였음

MA:Alcohol	발색라인	MA:Alcohol	SEM
1:1		1:1	
1.05:1		1.05:1	
1.1:1		1.1:1	
1.2:1		1.2:1	
1.3:1		1.3:1	원단 파단/공보/수축/PET 박리 SEM 분석 안함

그림 82. 1:1의 비율로 배합했을 때 가장 안정적인 품질을 나타냄

- (글로벌 제품과 동등한 성능, DAF140) 본 연구개발과제를 통해 DAF140의 성능을 향상시키는 것을 목표로 했으며, 기존 상용화된 제품을 대체할만한 수준까지 품질을 개선하고자 노력하였음
- 조성물의 비율을 바꾸거나, 후처리를 통해 품질을 향상시켰으며, 아래 그림에서 볼 수 있듯이 타사 제품과 동등한 수준의 성능을 나타내었으며, 이는 DAF140이 대체 가능한 수준의 제품임을 알 수 있음

회사명	UMTR	M사	S사
전개속도	140 s	140 s	140 s
분주 라인 균일성			
발색 이미지			
발색 측정값 (RGB)	2818.7	2738.2	2818.5
발색수치 (vs S사)	100%	97.2%	100%

그림 83. DAF140 성능 테스트

### o DAF110 제품의 품질 개선을 통한 신속 진단키트 적용

- (NaOH 전처리를 통한 성능 향상) NaOH를 0~1.5%의 농도로 제조한 후 NC의 혼합하여 전처리를 진행하였으며, NaOH의 농도가 증가함에 따라 전개속도가 증가하는 것을 확인할 수 있음
- 0.5% NaOH를 처리하였을 때는 전처리를 하지 않은 멤브레인과 전개속도가 크게 차이가 없음을 확인하였으며, 0.75%의 농도부터 전개속도가 향상되어 1.5% NaOH로 전처리하였을때는 전개속도가 110 이상으로 올라가는 것을 확인하였음
- NaOH 전처리 결과 0.75%와 1% 사이의 농도가 DAF110에 해당하는 전개속도를 갖출 수 있는 멤브레인을 제조하는데 최적임을 알 수 있음

NaOH 처리농도 %	두께(mm)	wicking
0	110	36/39
0.5	112	38/40
0.75	94	48/50
1	96	53/55
1.5	129	62/68

그림 84. NaOH 전처리를 통한 전개속도 향상

- NaOH의 농도가 올라갈수록 전개속도는 향상하지만 발색수치가 낮아지는 것을 확인할 수 있음. 0.75%로 전처리했을 때 발색수치가 가장 높았으며, 농도가 증가할수록 발색수치가 감소하는 것을 확인하였으며, 1.5%의 농도는 기존 제품 대비 70% 정도의 성능으로 감소하는 것을 확인할 수 있음
- NaOH 전처리를 통해 전개속도 향상과 더불어 발색 수치 성능을 보존할 수 있는 농도는 0.75~1% 사이의 농도로 확인되었으며, 전개속도를 유지하면서 분주라인 및 발색수치를 증가시킬 수 있는 후처리 진행이 필요함

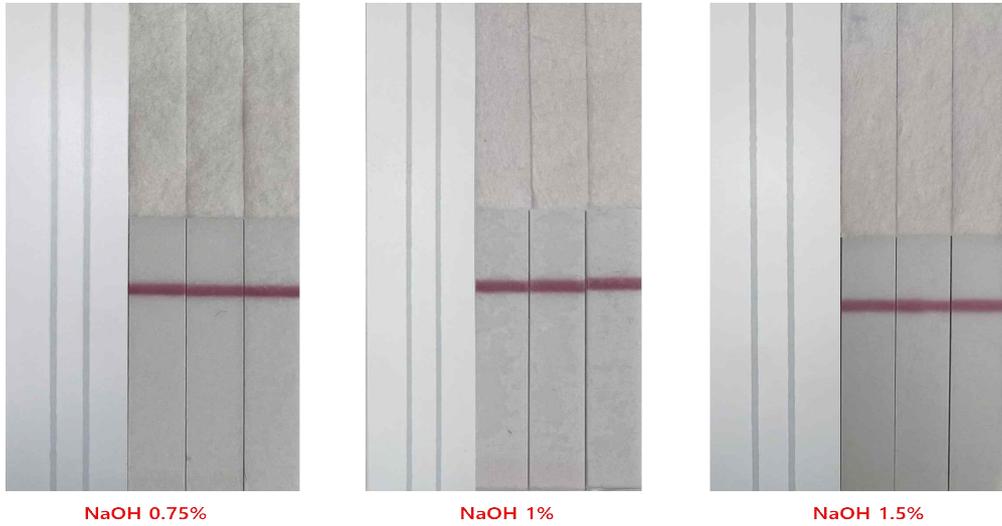


그림 85. NaOH 전처리를 통한 분주라인 및 발색수치

- (후처리를 통한 품질 개선) 기존 레시피를 이용하여 DAF110 제품을 개발하였으나, 발색 수치를 향상키기 위해 NaCl 및 KCl을 이용하여 후처리를 진행하였음
- NaCl의 경우 0~1%의 농도로 진행하였으며, NaCl의 농도가 증가할수록 분주라인이 개선되며, 발색수치가 향상하는 것을 확인할 수 있었으나 전개속도가 조금 감소하는 경향을 확인하였음
- NaCl dipping 처리의 경우 0.75%에서 상용화 제품인 CN140 대비 98%의 발색수치 성능을 나타내었으며, 0.5%의 경우 약 91%의 발색수치 성능을 나타내었음



그림 86. NaCl 농도에 따른 분주라인 및 발색수치 개선

Sample	두께 (um)	Wicking (140s, mm)	NaCl dipping %
1	108	50	0
2	107	48	0.25
3	109	47	0.5
4	109	45	0.75
5	112	45	1

그림 87. NaCl 농도가 증가함에 따른 전개속도의 변화

- KCl의 경우 0~0.5%의 농도를 이용하여 품질 개선을 진행하였음. KCl의 경우 전체적으로 분주라인 개선뿐만 아니라 발색수치 개선에도 영향을 주었으며, 특히 KCl 후처리 진행시 전개속도가 조금 향상되는 것을 확인하였음
- 이는 신속 진단을 하는데 필요한 성능으로 전개속도가 빠를수록 신속한 진단이 가능함을 의미함.
- KCl 후처리를 진행하였을 때 전개속도는 유지하면서 발색수치를 CN140 대비 92~98%까지 향상시킴을 확인하였음

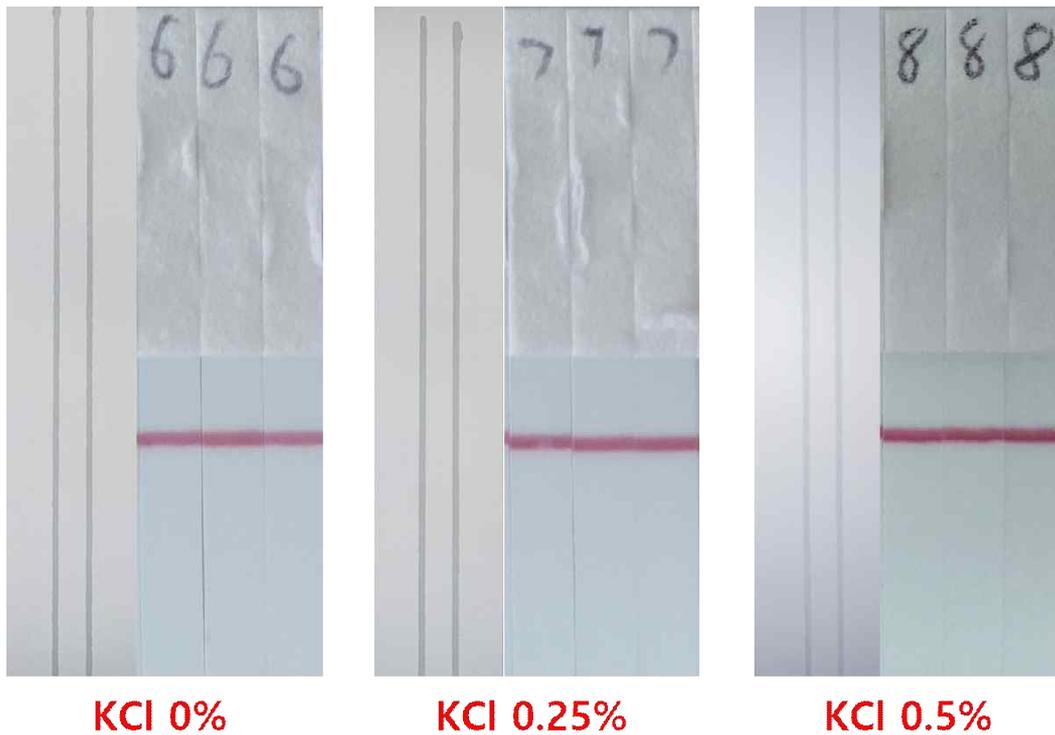


그림 88. KCl 농도에 따른 분주라인 및 발색수치 개선

Sample	두께 (um)	Wicking (140s, mm)	KCI dipping %
6	106	45	0
7	109	50	0.25
8	109	54	0.5

그림 89. KCI 농도에 따른 전개속도의 변화

o ISO13485를 통한 글로벌 품질 기준 충족

- 안정적으로 멤브레인 제품을 생산하고 양질의 서비스를 제공하기 위하여 글로벌 품질 기준을 충족시킬 필요성을 느꼈으며, 국제표준에 부합하는 생산 규격을 갖추기 위해 ISO13485를 획득하였음.
- 또한 제품의 안정적인 생산 및 친환경적인 방법으로 제품을 생산하기 위해 노력하였으며, UN SDGs에서 주관하는 지속가능우수기업 및 클린기업으로 선정되었음

ISO 13485 품질경영 안정적 생산을 위한 품질경영 도입

CBP 클린기업, GSP 지속가능우수기업 선정



그림 90. 획득 인증서

❖ 위탁연구개발기관 - 조선대학교

<1차년도>

1) SFTS 바이러스 항원 후보물질 확보

- ✓ SFTS 바이러스의 genome은 large(L), Medium(M), small(S) segment로 구성되어 있고, RNA dependent RNA polymerase(RdRp), glycoprotein precursor(M), glycoprotein N(Gn), glycoprotein C(Gc), nuclear protein(NP), non-structural protein(NSs)의 6개의 단백질을 암호화함.

- ✓ 국내 유행 SFTS 바이러스 항원 후보물질 확보 - 국내 다기관 코호트 연구를 통해 수집한 SFTS 국내 발생 환자의 검체를 이용하여 SFTS 바이러스의 유전자 서열을 분석하고 China, Japan, Korea clade를 포함하는 유전형을 확인하였음.

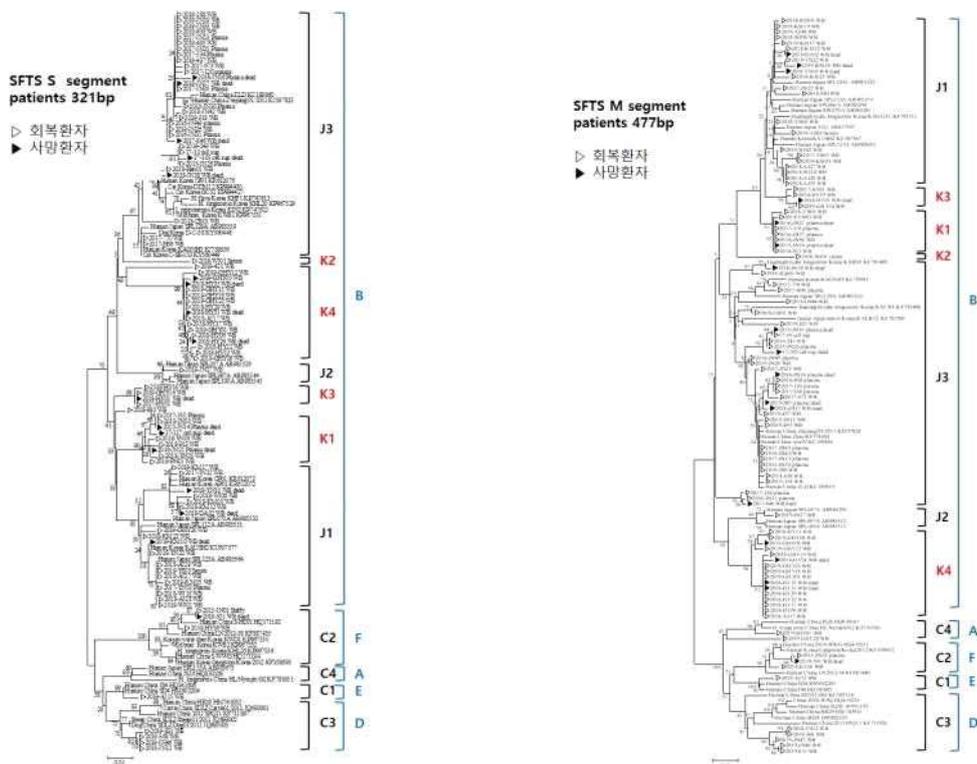


그림 91. 국내 다기관 코호트 연구를 통한 SFTS 환자의 SFTS virus Phylogenetic trees

- ✓ SFTS 환자의 혈액에서 분리한 SFTS 바이러스 배양액에서 RNA를 추출하여 S, M, L segment의 open reading frame (ORF) sequencing을 수행하였음. 다양한 SFTS 환자에서 분리한 바이러스의 ORF sequencing을 이용하여 NP 단백질 서열을 비교하였음.

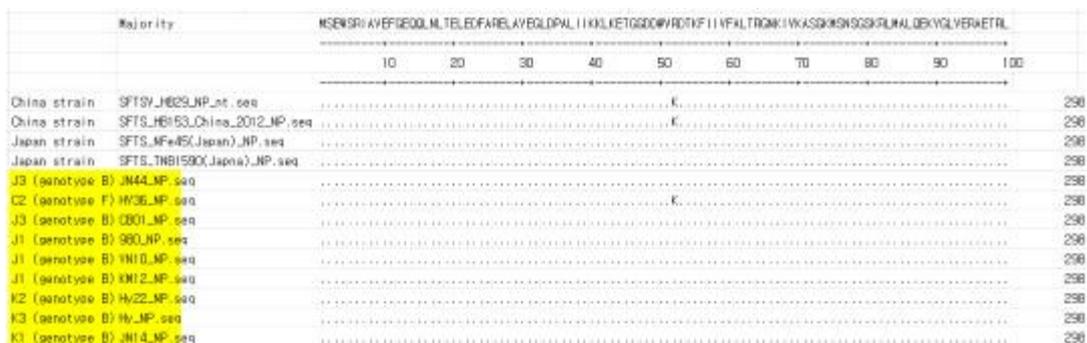


그림 92. 환자에서 분리한 SFTS 바이러스 유전형별 S segment NP 아미노산 서열비교

✓ SFTS S segment 내 최적의 항원 결정기 분석

- Bioinformatics와 protein database를 기초로 유전체 및 단백질에 대한 서열과 구조정보의 방대한 데이터를 토대로 항원 단백질 예측
- SFTS 바이러스의 L, M, S segment 서열을 이용하여 domain exclusion analysis (ubiquitous domain analysis, search for domains prone to post translation modification), transmembrane domain search, signal peptide search, hydrophobicity & antigenicity analysis 수행
- Bioinformatics와 protein database를 기초로 SFTS 바이러스의 S segment 내 최적의 항원성을 보이는 peptide epitope candidates를 선정

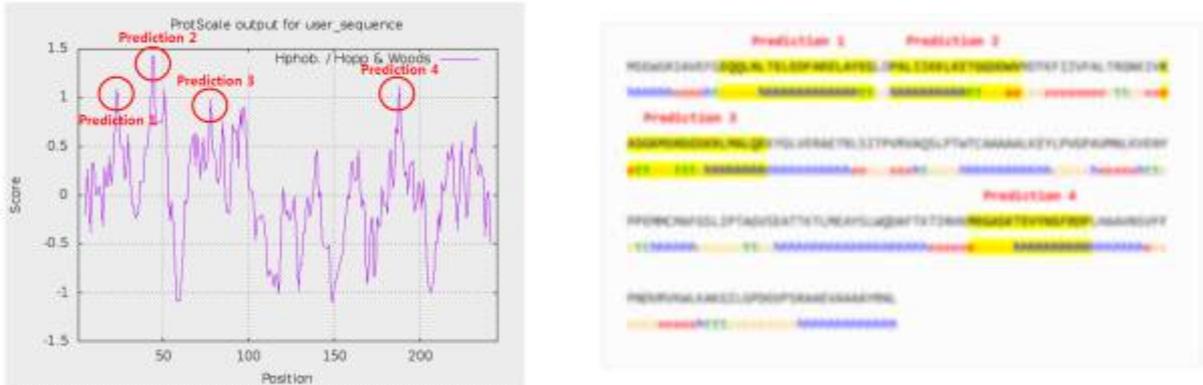


그림 93. SFTS 바이러스의 S segment의 hydrophobicity & antigenicity 분석 및 2nd structure analysis

- ✓ *E. coli* 기반 SFTS 바이러스 NP 단백질 발현 및 생산 - 환자에서 분리한 SFTS 바이러스의 NP 단백질 유전자를 C-terminal 6xHis-tag 형태로 pET23a vector에 클로닝 후 0.1 mM IPTG induction(37°C 4 hr)을 통해 그 발현을 확인하였으며, Ni-NTA affinity chromatography 법을 이용하여 재조합 단백질을 정제하였음. SFTS 바이러스의 NP 재조합 단백질은 soluble 하였으며, 최종 용출(50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 50%(v/v) glycerol 조건)된 단백질을 SDS-PAGE와 Coomassie blue staining한 결과 정제한 NP 재조합 단백질(~27.9 kDa)의 purity가 90% 이상임을 확인하였음.

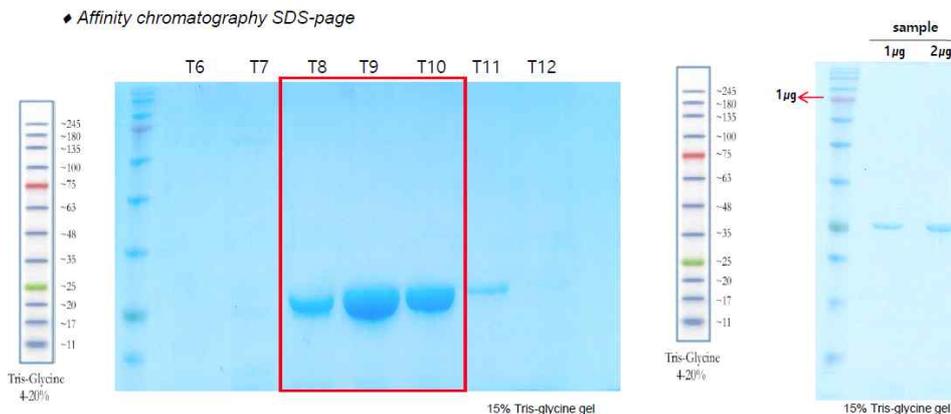


그림 94. SFTS 바이러스의 NP 재조합 단백질 발현 및 정제

- ✓ SFTS 바이러스 NP 재조합 식물단백질 발현 및 생산 - 식물기반 SFTS NP 재조합 단백질 발현을 위해 *Nicotiana benthamiana*를 이용하였으며, full NP 단백질을 식물발현 바이러스 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였음.

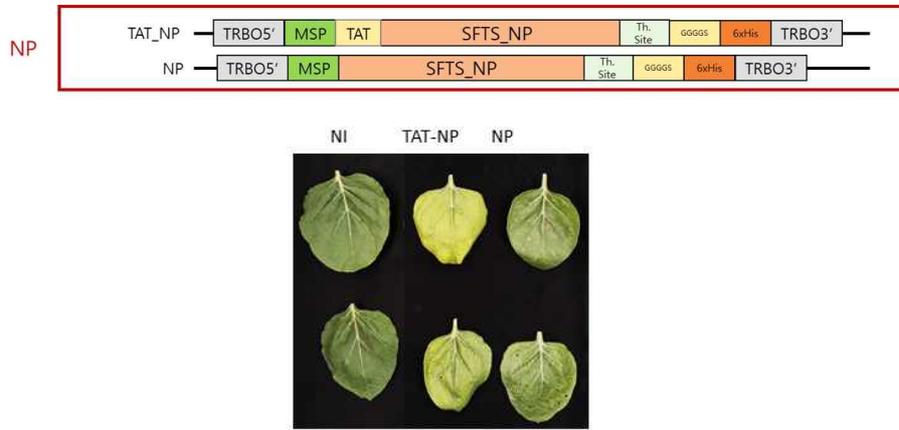


그림 95. SFTS 바이러스 NP 재조합 단백질 발현을 위한 식물발현 바이러스 벡터 및 *Nicotiana benthamiana* 잎 사진 (MSP: Murine signal peptide; Th site: Thrombin site; GGGGS: linker)

- ✓ SFTS NP 단백질 유전자를 C-terminal 6xHis-tag 형태로 식물발현 vector에 클로닝 후 식물(*Nicotiana benthamiana*)을 이용하여 발현하였으며, Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography fast flow resin을 이용하여 재조합 단백질을 정제하였음. SFTS 바이러스의 NP 재조합 단백질은 soluble 하였고 최종 용출(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8.03 in 500 mM Imidazole)된 단백질을 SDS-PAGE와 Coomassie blue staining 및 western blotting한 결과 정제한 NP 재조합 단백질(~29.2 kDa)을 확인하였음.

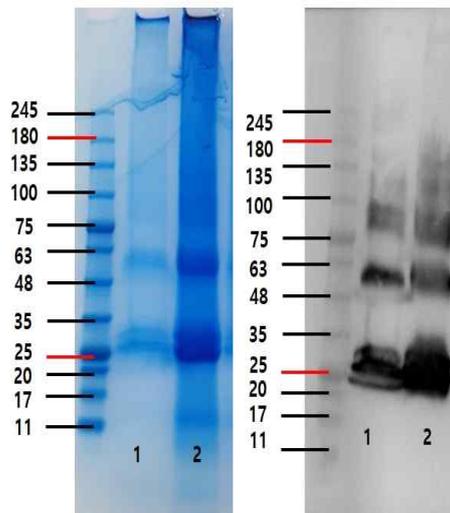


그림 96. SFTS 바이러스 NP 식물기반 재조합 단백질의 SDS-PAGE 및 western blotting 결과

## 2) SFTS NP 재조합 단백질에 대한 다클론 항체 확보 및 정제

- ✓ SFTS NP 재조합 단백질을 이용하여 3차 boosting한 토끼 면역혈청(토끼 anti-NP 다클론 항체)를 확보하였으며, SFTS NP 재조합 단백질 1 ug을 항원으로 사용하여 토끼 anti-NP 다클론 항체와 항원 단백질과의 반응성을 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하여 밴드를 확인하였음.

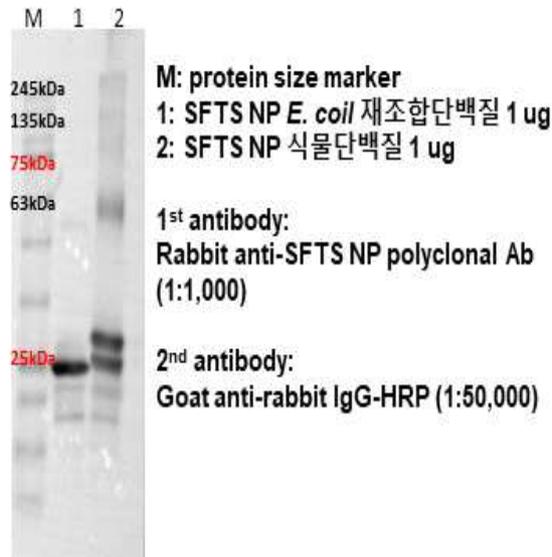


그림 97. SFTS 바이러스 NP 재조합 단백질에 대한 토끼 anti-SFTS NP 다클론 항체를 이용한 Western blotting결과

## <2차년도>

### 1) SFTS 바이러스 배양법

- SFTS 바이러스를 감염시킬 Vero E6 세포를 T-75 flask에 90% confluence로 준비하고 DPBS로 2회 세척 후 SFTS 바이러스 stock 1 mL과 2% FBS가 포함된 DMEM 1 mL을 섞어 접종하였음. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 15분마다 흔들어주며 1시간 동안 배양하고 접종액은 제거함. DPBS로 세척하여 unbound virus를 제거하고 감염 세포 배양용 배지 DMEM (10% FBS, 1X penicillin/streptomycin) 15 mL 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, 매일 현미경으로 세포병변(CPE, cytopathic effect)을 확인하였음. 5~7일 이후 세포가 rounding되며 세포 병변이 확인되었음. 배양한 바이러스는 inactivation 후 동물 면화에 사용하였음



그림 98. SFTS 바이러스 배양 후 현미경 상으로 세포병변 확인

### 2) 세포감염 확인을 위한 IFA 슬라이드 확인

- 세포병변 등이 확인된 경우 상등액은 vial에 나누어 deep freezer에 보관하고, 감염세포는 1X trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 떼어냄. 1,200 rpm에서 3분 동안 원심분리하고 얻은 세포는 40 mL DMEM (10% FBS, PC/SM)배지에 충분히 suspension하였음. Square dish에 항원 코팅용 슬라이드를 준비하고 각 well에 20 uL 도말한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 overnight 배양한 후 80% acetone을 이용하여 -20°C에서 고정화하고 SFTS 바이러스 항원 슬라이드를 제작하였음

- SFTS 환자의 회복기 혈청을 이용하여 IFA를 수행하였고, 감염 세포 내 형광 시그널을 확인할 수 있음

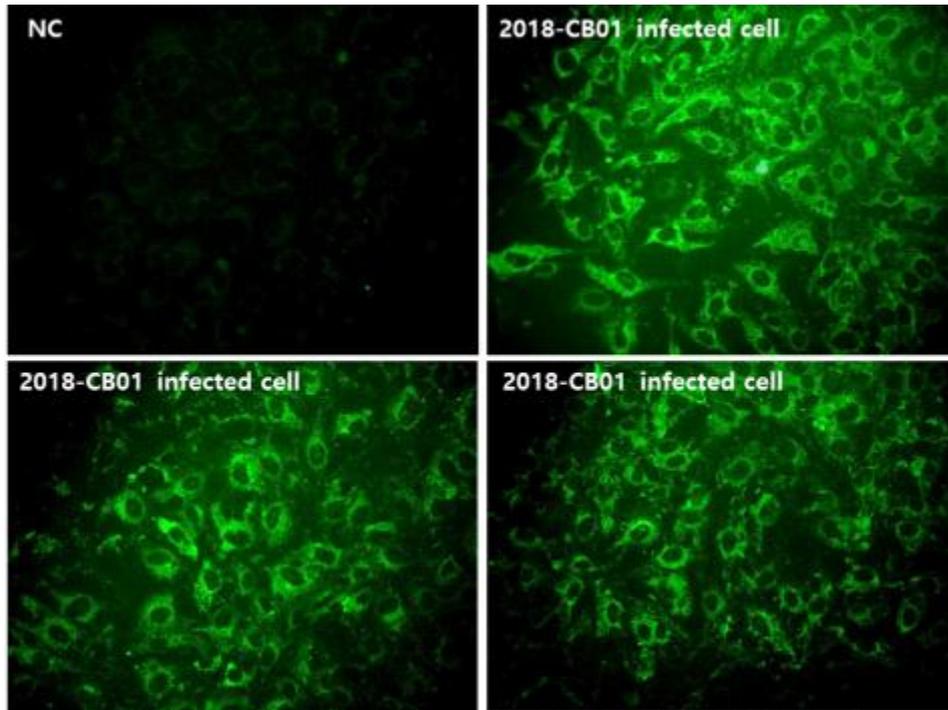


그림 99. SFTS 환자 혈액에서 바이러스 분리 및 IFA 확인

### 3) 식물 SFTS NP 재조합 단백질의 순도 개선 및 대량 정제

- Plant 기반 SFTS NP 재조합 단백질의 정제 순도를 개선하기 위해 다음과 같이 추가 연구를 진행하였음. 하였음. 형질 전환 및 파쇄 → 1차 원리분리 → 20 um filtration → 2차 원리분리 → 0.2 um filtration을 수행 후 Ni-NTA agarose를 이용하여 1차 정제 (Immobilized Metal(Ni) Ion Affinity chromatography)하였음. 이후 Q Sepharose FF(GE) column을 이용하여 2차 정제를 진행하였음(Ionic chromatography). 마지막으로 Sephacryl S100 agarose column을 이용하여 3차 정제(Gel filtration chromatography)를 진행하였음. 이들 단계를 거쳐 이전보다 순도가 개선된 SFTS NP 재조합 단백질을 확인하였으며, 최종 PBS, 10% glycerol, pH 7.4 완충용액에 재조합 단백질을 각각 현탁한 뒤, SDS-PAGE 및 다클론 항체를 이용 western blotting으로 타겟 band를 확인하였음

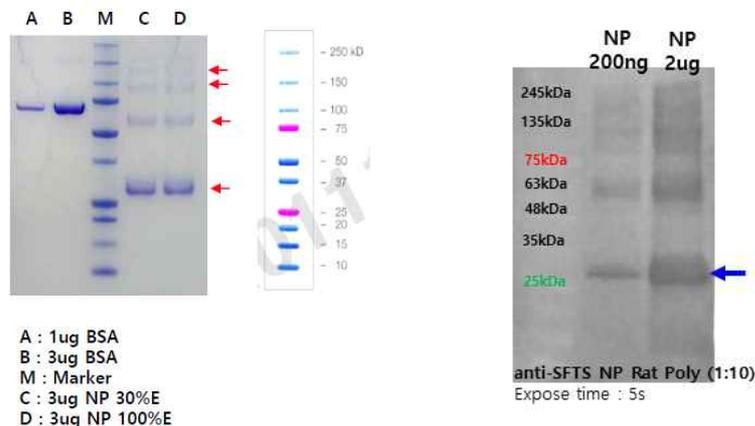
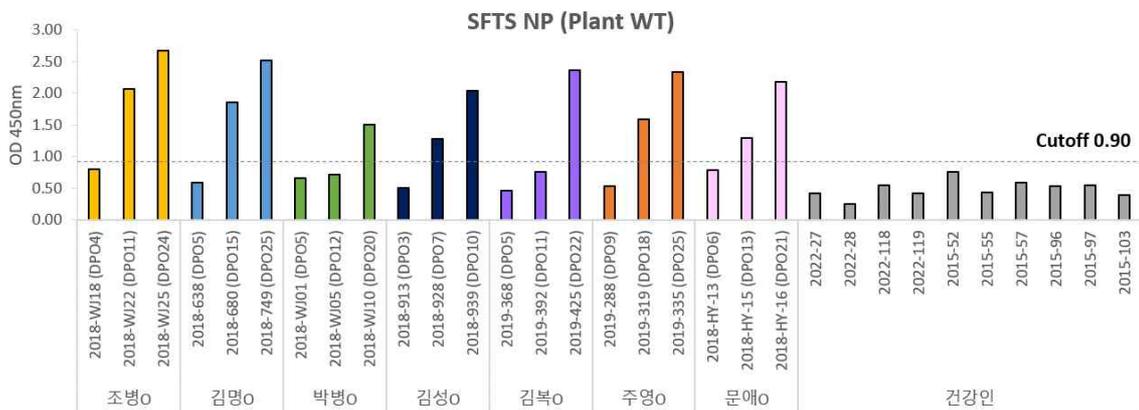


그림 100. 순도 개선된 plant 기반 SFTS NP 재조합 단백질의 SDS-PAGE 및 랫트 다클론 항체를 이용한 western blotting 결과

#### 4) SFTS NP 재조합 단백질을 항원으로 Indirect ELISA 수행 및 항체 검출

- *E. coli* 기반의 protein expression system을 이용한 SFTS NP 재조합 단백질과 식물 기반의 protein expression system을 이용하여 생산한 SFTS NP 재조합 단백질을 항원으로 SFTS 환자 급성기 및 회복기 혈청과 건강인의 혈청을 이용하여 Indirect ELISA를 수행함
- 급성기 SFTS 환자 혈청과 비교하여 회복기 SFTS 환자 혈청에서 OD<sub>450</sub> 값이 증상발생 후 시일이 증가함에 따라 점차 증가하였으며, 모든 회복기 SFTS 환자의 혈청에서 cut-off 이상의 OD<sub>450</sub> 값을 확인함
- *E. coli*에서 발현시킨 SFTS NP 단백질과 식물 기반으로 발현시킨 SFTS NP의 결과를 비교하였을 때, 식물을 이용하여 정제한 SFTS NP 단백질이 *E. coli*에서 발현시킨 SFTS NP 단백질보다 낮은(효과가 더 좋은) cut-off 값과 더 높은 민감도 지닌 것을 확인함

(A)



(B)

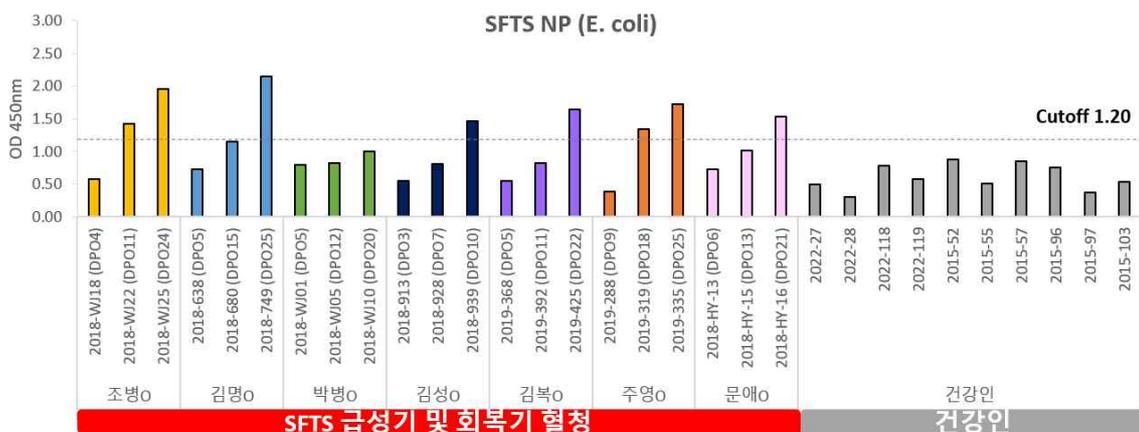


그림 101. SFTS 환자의 항체 검출을 위한 식물 기반(A) 및 *E. coli* 기반(B) SFTS NP Indirect ELISA 결과

#### 5) SFTS 바이러스 동물 감염 항체 진단용 ELISA setting

- 동물 감염 SFTS 바이러스 진단용 ELISA 시험법을 setting 하였으며 다음과 같은 방법으로 진행함. 96-well immunoplate에 SFTS NP 재조합 단백질을 코팅(4°C, overnight)시킨 후, 5% skim milk를 이용하여 37°C incubator에서 2시간 blocking 하였음. SFTS NP 재조합 단백질과 반응하는 1차 항체로 SFTS에 감염된 동물 혈청과 SFTS에 감염되지 않은 건강한 동물 혈청을 희석하여 37°C incubator에서 1시간 반응시키고, 세척 후 HRP 효소가 결합된 2차 항체(Goat anti-dog IgG Secondary Antibody-HRP, 또는 Goat anti-cat IgG Secondary Antibody-HRP)를 37°C incubator에서 1시간 반응시켰음. 세척 과정을 거친 후

- TMB(liquid, Sigma) 기질 용액을 첨가하고 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 반응 정지시켜 ELISA reader 장비를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함
- 실험에 사용된 SFTS 바이러스 양성 및 음성 동물 혈액은 주관기관((주)바이오메트로)을 통해 잠실 베스트동물메디컬센터로부터 공급받아 해당 연구에 사용하였음. 실험 결과 SFTS 음성 동물의 모든 혈청에서 cut-off(OD<sub>450</sub> 0.18) 미만의 OD<sub>450</sub> 값을 보였으며, SFTS 양성 동물 혈청을 이용하였을 때 cut-off 이상의 높은 OD<sub>450</sub> 값을 확인함

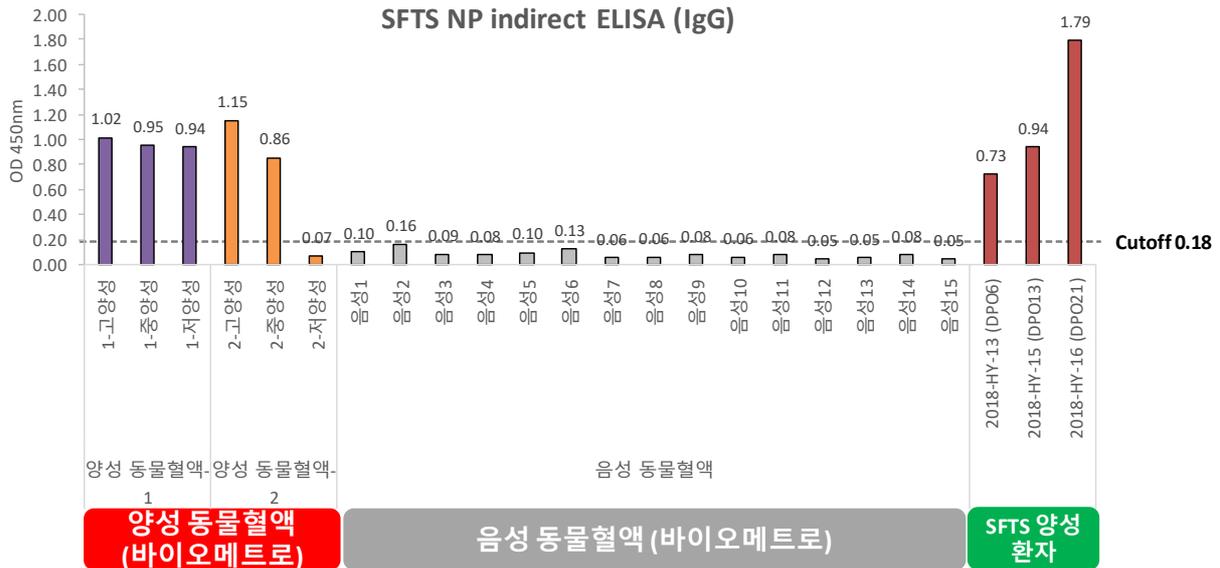


그림 102. SFTS 감염 동물 혈청을 이용한 SFTS 항체 진단용 Indirect ELISA 결과

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

###### ▶ LFA용 카트리지 구조 최적화

- 전용 카트리지 설계 및 금형 제작

###### ▶ C-ECL 진단기기 성능개선 (SiPM)

- SiPM 모듈 제작 및 냉각소자(펄티어)를 적용한 dark noise 개선
- SiPM 모듈 진공 유지를 위한 하우징 구조 설계 변경
- 광학구조 개선을 통한 성능 향상
- 실용성과 사용자 편의성이 강조된 진단기기 디자인 설계 변경
- GUI(Graphic User Interface) 구성

###### ▶ C-ECL 진단기기 항원/항체 안정화 테스트

- 항원/항체 안정화를 위한 Blocking Buffer 조건 최적화

---

▶ C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화

- 고정 버퍼 변경 테스트 결과 TSA, PBS 사용 가능함을 확인

▶ 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용

- 대체 발광물질로 Ruthenium 가능성 확인

▶ 민감도 특이도 평가

- 현재 항원 조합에서 C-ECL, LFA 진단키트로 중농도 표준물질의 검출까지 가능함을 확인

▶ 장기 보관 안정성 평가

- 진단키트의 가속노화 테스트를 통해 상온에서 약 3개월 안정성 확보

▶ 물리 화학적 밸리데이션 수행

- Buffer의 최적 pH 조건 확보

▶ 시제품 제작

- 기초 테스트를 위한 임시 시제품 2종 제작

▶ 실검체 표준물질 제작

- 동물병원에서 수집한 동물 실검체를 이용하여 표준물질 제작

▶ NC 멤브레인 동등성 테스트 (LFA)

- 공동연구기관인 움틀에서 제조한 멤브레인이 기성품과 동등한 성능을 보여 진단키트 제작에 적용함

▶ 최적화 테스트 (LFA)

- 항원/항체 농도 및 blocker를 조절하여 최적화 완료

▶ 검체 점적 방법 및 채취 도구 테스트 (LFA)

- 검체 채취 및 점적 방법을 확정하여 시제품에 적용함

▶ 포장 박스 제작 (LFA)

- 표시기재 사항에 맞추어 박스를 제작하였고, 박스 안에 첨부될 사용설명서도 함께 제작 완료

▶ 분석적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA)

- 최소검출한계, 교차반응, 간섭반응, 반복성, 재현성, 사용기한 설정 실험 완료

▶ 임상적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA)

- 양성 10개, 음성 20개 검체로 자체 임상 평가 수행 완료
- 민감도 100%, 특이도 100% 결과를 얻음

---

▶ **실검체 표준물질 C-ECL 테스트**

- 제작된 실검체 표준물질을 C-ECL에 적용하여 테스트

▶ **C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화**

- TSA, Piranha, Piranha+APTES 등의 방식을 이용하여 항원/항체 고정화 최적화 완료

▶ **음성 실검체 비특이 반응 확인 (C-ECL)**

- 18개의 단일 음성 검체를 통해 확인한 결과 비특이 반응이 나타나지 않았음

▶ **분석적 성능평가 (C-ECL)**

- 최소검출한계, 교차반응, 간섭반응, 반복성, 재현성, 사용기한 설정

▶ **바이오마커 발광물질 C-ECL 적용**

- 최적 발광물질 선정 및 최적화 테스트

▶ **카트리지 및 전용 장비 목업 준비**

- 카트리지 구조 최적화 및 기기 호환 테스트

▶ **카트리지 안정성 테스트**

- 정밀성 테스트 및 보완

▶ **SiPM ECL Analyzer 시제품 설계 및 제작**

- 단일 바이오마커의 분석이 가능한 단일 SiPM 센서모듈의 적용
- 현장에서 사용이 가능한 hand-held 형태의 제품 설계
- 외부 디스플레이와 배터리를 추가하여 사용 편의성 확보
- 센서 모듈에서 발생하는 열을 효과적으로 배출하기 위한 방열구조 설계

▶ **NC (nitrocellulose) 멤브레인의 백킹(backing)기술 개발 1건**

- 단면 corona RX600, 양면 우레탄 V7610, Slip PET SH71S등의 여러 가지 PET 백킹 필름을 제조 공정에 시험하여 현 움틀 NC멤브레인 제조 용액 배합 및 공정과의 사용성이 가장 뛰어난 백킹 필름인 Slip PET SH71S를 선택함

▶ **LFA용 NC 멤브레인 상용화, 대량생산 기술 개발 1건**

- NC 멤브레인 상용화, 대량생산을 위하여 pilot 장비 설계 및 설치를 완료 하였으며, 동 과제 진단키트의 원자재로 사용될 수 있을 정도의 NC 멤브레인 품질 도달을 위해 연구를 진행함
- 제조 NC 용액의 점도를 변경하기 위해 RS20~120의 시험군을 test하였으며, 현 제조 공정에 RS80이 가장 적합하다고 판단함
- 물 함량 10.5wt%에서 표면 구조가 가장 안정적이고 적합한 것을 확인함
- CA는 첨가량이 늘어날수록 표면에 pore 형성에 도움을 주어 pore를 열어주며, SDS와 함께 작용하여 SDS양이 많아질수록 pore 크기를 증가시켜 열린 pore 구조의 틀을 잡아주는 역할로 예상되어 추후 개발에 CA와 SDS를 혼용하는 배합비를 활용하고자 함
- PEG를 기존 NC 용액에 첨가함으로써 발색 라인이 선명해지고, wicking이 증가하는 것을

---

확인하였고, lab scale과 pilot간의 오차가 있지만 그 경향성이 일치하는 것으로 보여, 이를 활용한 추가 연구가 필요하다고 판단함

▶ **DAF110 개발**

- 40 mm를 전개하는데 110초 ( $\pm 25$ 초)를 만족하는 값을 갖는 멤브레인을 코팅하기 위해 각종 용액 배합비와 공정조건을 변경하며 연구를 진행함
- 특정 조건에서 전개속도 110초를 충분히 만족하는 샘플군을 확보함

▶ **NC 멤브레인 품질 향상을 위한 배합 조건 최적화 진행**

- (후처리를 통한 DAF140 성능 개선) SDS를 농도별로 dip coating을 진행하여 DAF140의 분주라인 및 발색 정도 성능을 향상시키고자 연구를 진행함
- VIPS-NIPS 공정에서 SDS와 같은 계면활성제를 수조에 첨가한 후 dip coating을 진행함
- 균일한 분주라인이 생성될 수 있도록 하기 위해 SDS의 농도를 0~2wt% 수준으로 진행하였으며, 분주라인 이외에도 발색수치를 향상시킬 수 있는 조건을 최적화하였음
- (용매 비율 변경을 통한 품질 향상) IPA : EtOH 비율 변화에 따른 NC 멤브레인의 품질 변화를 측정하였으며, Alcohol : MA 비율 변화에 따른 품질 최적화를 진행하였음
- IPA : EtOH 비율의 최적화를 진행한 후 조성물의 비율을 고정한 후 Alcohol : MA 비율 변화에 따른 결과를 측정하였음

▶ **DAF110 제품의 품질 개선을 통한 신속 진단키트 적용**

- (전개 속도 개선) DAF110의 전개속도를 만족시키기 위해 강염기 특성을 가진 물질을 이용하여 연구를 진행하였음.
- 기존 DAF110을 제조할 수 있는 recipe를 확보하였지만, 더욱 더 용이한 방식으로 멤브레인을 제조하고 성능을 향상시키기 위한 연구를 진행하였음
- (NaOH 전처리) NC를 NaOH 0~1.5%의 농도로 전처리를 진행하여 멤브레인을 제조하였음. 상온에서 1시간 교반 후 D.W로 세척을 진행한 후 NaOH로 전처리된 NC를 다른 조성물들과 혼합하여 고분자 용액을 제조하였으며, 롤투를 슬롯다이 머신을 이용하여 NC 멤브레인을 제조하였음
- (품질 개선) ㈜움틀은 본 과제를 통해 DAF110을 제조할 수 있는 recipe를 획득하였으며, 제품화를 하기 위해 분주 라인 개선 및 발색 수치 향상을 위한 연구를 진행하였음
- NaCl 및 KCl과 같은 물질을 이용하여 후처리를 진행하였으며, VIPS 공정을 통과한 멤브레인이 NaCl이 첨가된 수조에 dipping되면서 후처리가 일어날 수 있도록 설계하였음
- NaCl 농도의 경우 0~1%의 비율로 실험을 진행하였으며, 농도가 1%가 넘어가면 발색 수치가 현저히 낮아지는 것을 확인하였음

▶ **SFTS 바이러스 항원 후보물질 확보**

- 국내 유행 SFTS 바이러스 유전자 서열 분석 및 유전형 확인
- SFTS 환자로부터 바이러스 분리 및 ORF 서열을 이용하여 SFTS NP 단백질 서열비교
- SFTS S segment 내 최적의 항원 결정기 분석
- SFTS 바이러스 NP 재조합 식물단백질 및 E. coli 기반 SFTS NP 재조합 단백질 발현 및 생산

▶ **SFTS NP 재조합 단백질에 대한 다클론 항체 확보 및 정제**

---

- 토끼에 SFTS 바이러스 NP 재조합 단백질을 3차 부스팅 한 후 면역혈청 확보함(토끼 anti-SFTS NP 다클론 항체)
- Western blotting을 수행하여 SFTS 불활성화 바이러스 및 SFTS NP 재조합 단백질과 토끼 anti-SFTS NP 다클론 항체의 특이적인 반응성 확인

▶ SFTS NP 재조합 단백질을 항원으로 Indirect ELISA 수행 및 항체 검출

- SFTS virus 배양법 확립 및 IFA를 이용한 SFTS 바이러스 감염 확인
- *E. coli* 기반의 SFTS NP 재조합 단백질 대량 확보
- 식물 기반의 SFTS NP 재조합 단백질 순도 개선 및 대량 확보
- Indirect ELISA를 이용하여 *E. coli*와 식물 기반 SFTS NP 재조합 단백질의 항원성 확인 및 비교
- SFTS 양성 환자의 급성기 혈청 및 회복기 혈청 확보
- SFTS 양성 환자의 혈청을 이용한 Indirect ELISA 수행을 통하여 항체 검출 확인

▶ SFTS 바이러스 동물 감염 항체 진단용 ELISA setting

- SFTS 양성 동물 혈청을 이용한 Indirect ELISA 방법 확립

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

- ▶ 특허 출원 4건 - (주)바이오메트로 2건, (주)움틀 2건
- ▶ 특허 등록 2건 - (주)움틀 2건
- ▶ 국제 표준 1건 - (주)움틀 1건
- ▶ 고용창출 13건 - (주)바이오메트로 6건, (주)움틀 7건
- ▶ 전문 연구 인력 양성 3건 - 조선대학교 3건
- ▶ 시제품 제작 2건 - (주)바이오메트로 1건, (주)움틀 1건

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		2022	2023	계	가중치 (%)
	전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허 출원	목표(단계별)	1	1	2
실적(누적)			1	3	4	10
특허 등록		목표(단계별)		2	2	5
		실적(누적)		2	2	5
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	고용창출	목표(단계별)	2	0	2	20
		실적(누적)	6	7	13	20
		목표(단계별)				
		실적(누적)				
계						

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신품종 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전	연구개발 목표치	목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	국내 성능수준		
					성능수준	1단계 (2022~2023)	

1	민감도 (ECL법)	%	10	-	개발 전	개발 전	90	RFP 요구사항
2	특이도 (ECL법)	%	10	-	개발 전	개발 전	95	RFP 요구사항
3	분석오차 CV% (ECL법)	%	10	-	-	-	5	RFP 요구사항
4	민감도 (RDT법)	%	10	-	개발 전	개발 전	90	RFP 요구사항
5	특이도 (RDT법)	%	10	-	개발 전	개발 전	95	RFP 요구사항
6	분석오차 CV% (RDT법)	%	10	-	-	-	5	RFP 요구사항
7	SFTS 바이러스 진단 매뉴얼	건	5	-	-	-	1	RFP 요구사항
8	야외임상	건	5	-	-	-	1	RFP 요구사항
9	실증시험	건	5	-	-	-	1	RFP 요구사항
10	SFTS 바이러스 항원, 항체 물질 확보	종	5	-	-	-	10	자체계획 수립
11	재조합 단백질 순도	%	5	-	-	-	90	자체계획 수립
12	품목허가 신청	건	10	-	-	-	2	RFP 요구사항
13	진단 시간	분	5	-	15	15	15	FDA등록 Abbott사 제품 - SFTS 아님

\* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

\* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

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

#### [과학적 성과]

##### 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

##### 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명

##### 기술 요약 정보

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

##### 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

##### 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	C-ECL 기반의 다중 검체 분석 장치를 이용한 다중 검체 분석 방법	대한민국	강길남 오천택 김대수	2022-07- 12	10-2022- 008546 0	-	-	-	-	10	-
2	C-ECL 기반의 다중 검체 분석 장치에서의 멀티 카세트 구동 시스템 및 방법	대한민국	강길남 오천택 김대수	2023-04- 21	10-2023- 005250 7	-	-	-	-	10	-
3	강염기를 통해 친수성이 향상된 개선된 니트로 셀룰로오스 멤브레인의 제조방법	대한민국	주식회사 움틀	2023-12- 20	10-2023- 018771 2	-	-	-	-	33	-
4	민감도가 개선된 니트로 셀룰로오스 멤브레인의 제조방법	대한민국	주식회사 움틀	2023-12- 29	10-2023- 019714 0	-	-	-	-	33	-
5	셀룰로오스 멤브레인의 제조방법	대한민국				주식회사 움틀	2023-11- 21	10-2606 358		-	-
6	컨트롤 라인과 테스트 라인이 무작위로 배열되고 이의 식별 코드를 포함하는 진단 키트 및 이 를 이용한 진단 방법 및 시스템	대한민국				주식회사 움틀	2023-11- 02	10-2599 342		-	-

○ 지식재산권 활용 유형

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

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1,2	√		√						√	
3,4	√								√	

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

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

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자
1	국제 표준	ISO13485	ISO	의료기기			국제 표준	(주)윙틀	ISO13485:2016	2022.11.11

\* 1) 국제 표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제 표준 초안(WD), 위원회안(CD), 국제 표준안(DIS), 최종 국제 표준안(FDIS), 국제 표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제 표준화기구(ISO), 국제 전기 기술 위원회(IEC), 공동 기술 위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제 표준(IS), 기술 시방서(TS), 기술 보고서(TR), 공개 활용 규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	DAF140	2022년 9월	(주)윙틀	(주)윙틀	판매	3년 이내		
2	BM Canine SFTS Ab Rapid Gold	2023년 9월	(주)바이오메트로	(주)바이오메트로	성능평가용	2년 이내		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내 국외	진단제품 개발	제품화	바이오메트로	7,695		2022	20년
2	자기실시	신제품 개발	국내 국외	NC 멤브레인 DAF	제품화	(주)윙틀	7,500		2022	20년

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
진단제품 개발	2022	7,695		7,695	세금계산서
NC 멤브레인 판매	2022	7,500		7,500	세금계산서
합계		15,195		15,195	세금계산서

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		시장 점유율	현재까지	3년 후
	단위(%)			
	국내			

	국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	진단제품 개발	바이오메트로	2	3	5
2	NC 멤브레인 국산화	(주)옴틀	4	4	8
합계			6	7	13

고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	3
		생산인력	2
	개발 후	연구인력	7
		생산인력	6

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2022-2023	2	1			2	1				3	

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

## [그 밖의 성과]

---

○ 국내외 전시회 참여를 통한 NC 멤브레인 제품 전시 및 홍보

- 제주도에서 개최된 인터비즈에 참가하여 상용화된 NC 멤브레인에 대해 적극적으로 홍보하였으며, 타 바이오 기업들과의 협업을 통해 매출액을 발생 및 투자자들에게 기업 기술을 소개하였음
- 미국 서부 애너하임에서 개최된 AACC 2023 전시회에 참여하여 NC 멤브레인 제품인 DAF를 홍보하고 적극적인 시장 진출을 위해 노력하였음



2023 AACC 전시회 참여

- ASEAN 제약 산업 진출을 위해 태국, 동남아시아 의약품 박람회인 CPHi SEA 2023에 참여하여 NC 멤브레인 제품을 전시하였으며, 아세안 시장에 진출하기 위해 제품 홍보를 진행하였음



2023 CPHi SEA 전시회 참여

---

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ LFA용 카트리지 구조 최적화	○ 전용 카트리지 설계 및 금형 제작	○ 100
○ C-ECL 진단기기 성능개선 (SiPM)	○ SiPM 모듈 제작 및 냉각소자(펄티어)를 적용한 dark noise 개선 ○ SiPM 모듈 진공 유지를 위한 하우징 구조 설계 변경 ○ 광학구조 개선을 통한 성능 향상 ○ 실용성과 사용자 편의성이 강조된 진단기기 디자인 설계 변경 ○ GUI(Graphic User Interface) 구성	○ 100
○ C-ECL 진단기기 고정화 기술 최적화	○ 고정 버퍼 및 항원/항체 고정 프로토콜 확립	○ 100
○ 바이오마커 발광물질 C-ECL 적용	○ 최적 발광물질 선정 및 최적화 완료	○ 100
○ 시제품 제작 (LFA)	○ 검체 점적 방법 및 채취 도구 테스트 (LFA) ○ 포장 박스 제작 (LFA) - 표시기재 사항에 맞추어 제작	○ 100
○ 실검체 표준물질 제작	○ 민감도 향상을 위해서 수집된 동물 실검체를 이용하여 표준물질 제작	○ 100
○ NC 멤브레인 동등성 테스트 (LFA)	○ 공동연구기관인 움틀에서 제조한 멤브레인을 적용하기 위한 테스트에서 기성품과 동등한 성능을 보임	○ 100
○ 최적화 테스트	○ 항원/항체 농도 및 blocker를 조절하여 최적화	○ 100
○ 분석적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA, C-ECL)	○ 최소검출한계, 교차반응, 간섭반응, 반복성, 재현성, 사용기한 설정 시험 완료	○ 100
○ 임상적 성능평가 및 보고서 작성 (LFA)	○ 양성 10개, 음성 20개 검체로 자체 임상 평가 수행 ○ 민감도 100%, 특이도 100% 달성	○ 100
○ SiPM ECL Analyzer 시제품 설계 및 제작	○ 단일 바이오마커의 분석이 가능한 단일 SiPM 센서모듈의 적용 ○ 현장에서 사용이 가능한 hand-held 형태의 제품 설계 ○ 외부 디스플레이와 배터리를 추가하여 사용 편의성 확보 ○ 센서 모듈에서 발생하는 열을 효과적으로 배출하기 위한 방열구조 설계	○ 100
○ 품목허가 신청	○ 분석적 성능평가 자료 작성 완료 ○ 현재 국내에 임상평가를 위한 SFTS 동물검체 확보 병원이 없어서 자체적으로 검체를 확보	○ 90

○ NC 멤브레인 국산화 및 상용화	<p>하여 임상적 성능평가 수행함</p> <p>○ (주)옵틀은 Drop and Flow(DAF) 라는 브랜드로 NC 멤브레인을 상용화하는데 성공하였으며, 외산제품을 대체할만한 수준인 국산화 멤브레인 개발에 성공하였음</p>	○ 100
○ 대량생산 기술 개발	○ 롤투롤 슬롯다이 머신 공정을 설계하고 600mm 폭의 롤단위로 대량생산할 수 있는 설비를 구축하였음	○ 100
○ DAF110 개발	○ DAF110( $\pm 25$ 초)에 해당하는 성능의 멤브레인을 개발하였으며, 상용화된 타사 제품 대비 동등한 성능으로 개발하는데 성공하였음	○ 100
○ SFTS NP 재조합 단백질을 항원으로 Indirect ELISA 수행 및 항체 검출	<p>○ SFTS virus 배양법 확립 및 IFA를 이용한 SFTS 바이러스 감염 확인</p> <p>○ <i>E. coli</i> 기반의 SFTS NP 재조합 단백질 대량 확보</p> <p>○ 식물 기반의 SFTS NP 재조합 단백질 순도 개선 및 대량 확보</p> <p>○ Indirect ELISA를 이용하여 <i>E. coli</i>와 식물 기반 SFTS NP 재조합 단백질의 항원성 확인 및 비교</p> <p>○ SFTS 양성 환자의 급성기 혈청 및 회복기 혈청 확보</p> <p>○ SFTS 양성 환자의 혈청을 이용한 Indirect ELISA 수행을 통하여 항체 검출 확인</p>	○ 100
○ SFTS 바이러스 동물 감염 항체 진단용 ELISA setting	○ SFTS 양성 동물 혈청을 이용한 Indirect ELISA 방법 확립	○ 100

#### 4. 목표 미달 시 원인분석

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

✓ 품목허가 신청 (90% 달성)

과제 시작 시 예측으로는 SFTS 항체 양성인 동물 검체를 충분히 확보할 수 있을 것으로 판단했으나 현재 SFTS 항체 진단키트에 대한 후향적 임상시험이 가능한 동물병원은 없는 것으로 조사되었음

농림축산검역본부에 문의하였지만 임상을 진행할 병원과 논의하라는 답변만 있었음

동물병원이나 견주들의 동물용 SFTS 항체 검사에 대한 인식이 높지 않아서 검사 자체를 거의 하지 않아 확보된 검체가 없는 것으로 판단됨

전향적 임상시험으로 진행할 경우 시간과 비용이 현실적으로 불가능함

## 2) 자체 보완활동

여러 동물병원의 음성 검체(주요 질병에 대한 음성)를 확보하여 위탁연구기관에서 개발한 ELISA 스크리닝 방식으로 SFTS 항체 양성 검체를 개별적으로 확보함

## 3) 연구개발 과정의 성실성

자체 ELISA 스크리닝의 노력에도 100개의 검체에서 1~2개의 SFTS 항체 양성 검체만을 확보할 수 있었고, 최종적으로 기한 내에 자체 임상시험을 위해 확보한 SFTS 항체 양성 검체는 10개에 불과했음

SFTS 항체가 미확인된 약 1,000여개의 검체를 스크리닝하여 SFTS 항체 양성 검체 10개, 음성 검체 20개로 자체 임상 평가를 진행하여 민감도 100%, 특이도 100%를 달성하였음

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명		기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술 기여도	
									산정 근거	비율
음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속 진단 키트 개발	주관	음극전기화학발광법 및 측면유동분석을 이용한 SFTS 신속 진단 키트 개발	(주)바이오메트로	중소기업 (영리)	718.59	491.94	0.685	신규 기술개발	②-②	34.23
	공동	신속 진단키트(LFA)용 핵심 요소 기술 개발	(주)움틀	중소기업 (영리)	525.75	405	0.770	신규 기술개발	②-②	48.14
	위탁	반려동물 SFTS IgG/IgM 진단용 항원, 항체의 개발	조선대학교	대학 (비영리)	269.06	269.06	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
<b>계</b>					<b>1,513.4</b>	<b>1,166</b>	-	-	-	-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE			1	1	1
	비SCIE					
국내논문	SCIE		1	1	1	1
	비SCIE					
특허출원	국내		2	2	2	2
	국외		1	1	1	1
특허등록	국내		1	1	1	1
	국외			1	1	1
인력양성	학사		1	5	10	20
	석사			2	5	10
	박사			1	1	1
사업화	시제품개발	1	1			
	상품출시		1	1		
	기술이전					
	공정개발	1	1			
	매출액(단위 : 천원)		100,000	500,000	2,000,000	10,000,000
	기술료(단위 : 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 반려동물전주기 산업화기술개발사업 반려동물 맞춤형 의약품 및 서비스 개발과제의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 반려동물전주기 산업화기술개발사업의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.