

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000882-01

보.안.과.제.( ), 일.반.과.제.( O )

과.제.번.호. 20090076

돼지열병 진단시스템 제품개발 및 산업화  
( Development and Industrialization of Classical  
Swine Fever Diagnostic System )

베트올(주)

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지열병 진단시스템 제품개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 5 월 11 일

주관연구기관명 : 베트올(주)

주관연구책임자 : 김 정 미

세부연구책임자 : 김 정 미

연 구 원 : 이 현 식

연 구 원 : 정 용 훈

연 구 원 : 오 정 화

연 구 원 : 오 효 선

연 구 원 : 박 기 범

연 구 원 : 구 자 경

연 구 원 : 장 나 영

위탁연구기관명 : 건국대학교

산업협력단

위탁연구책임자 : 이 중 복

연 구 원 : 이 정 아

연 구 원 : 황 민 아

# 요 약 문

## I. 제 목

돼지열병 진단시스템 제품개발 및 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지열병바이러스 (Classical Swine Fever Virus: CSFV)에 의해 발생하는 돼지열병(Classical Swine Fever)은 2009년 현재 선진 축산국의 경우 조기 진단을 통한 철저한 방역을 통해 국제수역사무국으로부터 청정지역으로 선정되어 있지만 우리나라의 경우 지속적으로 발생이 되고 있다. 병돈 발생시 해당 지역의 비육돈의 수출 금지 및 병돈의 살처분에 대한 보상금을 지원하는 등의 양돈 농가 및 국가 재정의 손실이 발생하여, 전반적인 양돈 산업의 침체가 발생한다.

이상의 사실로 보아 국내 돼지열병 박멸을 위해, 현장에서 돼지열병바이러스를 신속하게 진단 할 수 있는 민감하고 특이적인 검사와 야외강독 돼지열병과 백신 접종에 의한 돈군의 감염을 감별하기위한 진단시스템 도입이 시급하다.

따라서, 본 과제를 통하여 신속하고 정확하게 돼지열병바이러스 1)항원진단, 2)항체진단 및 3)백신감별을 위한 현장 신속진단키트 (Point-of-care testing, POCT) 개발하고자한다. 개발된 진단제품들은 돼지열병에 관한 조기진단을 통한 돼지열병 바이러스 박멸 및 제어시스템을 제공함으로써 효과적인 방역관리 및 농가 소득증대에 이바지 할 수 있을 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

돼지열병을 보다 신속·정확한 진단시스템 확보를 위해 Lateral flow immunoassay (LFI) 기술을 이용한 돼지열병바이러스 항원진단, 항체진단 및 백신 감별 신속진단키트(POCT) 산업화의 내용은 다음과 같다.

첫째, 돼지열병바이러스 항원진단 신속진단키트 개발 및 산업화로 검체에 존재

하는 돼지열병바이러스의 E2(gp55) 항원을 탐지할 수 있는 항체 탐재 키트를 개발하고자 하였다.

둘째, 돼지열병바이러스 항체진단 신속진단키트 개발 및 산업화로 검체에 존재하는 돼지열병바이러스의 E2(gp55) 항체를 탐지할 수 있는 재조합 E2 항원 탐재 키트를 개발하고자 하였다.

셋째, 돼지열병바이러스 백신 감별 신속진단키트 개발 및 산업화로 검체에 존재하는 Erns 항체를 탐지할 수 있는 재조합 Erns 항원 탐재 키트를 개발하고자 하였다.

#### IV. 연구개발결과

돼지열병바이러스 항원진단과 항체진단 신속진단키트 개발을 위한 E2(gp55) 원료항원, 원료항체의 선정 및 제품화 적용을 위한 최종 생산 및 정제조건을 확립하였으며 백신 감별 신속진단키트 개발을 위한 Erns 원료항원 선정 및 제품화 적용을 위한 최종 생산 및 정제조건을 확립하였다. 또한 확보된 원료를 Lateral-flow immunoassay 기술에 적용하여, 돼지열병바이러스 항원진단, 항체진단 및 백신 감별 현장 신속진단키트(POCT)를 개발하였다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

돼지열병 조기진단 및 제어시스템을 위한 3가지 제품(항원진단, 항체진단, 백신 감별진단)를 개발 하였다. 현장에서 신속하고 정확한 진단시스템의 개발을 통해 돼지열병 전염병의 조기진단 등 위해성에 대한 효과적인 대처방안으로 활용 가능하다. 돼지열병 근절을 위한 정부의 마커백신 도입에 따라 효과적인 백신사업에 활용될 것으로 기대한다. 개발된 신속진단키트는 기존 분석법과 달리 기술에 대한 전문 지식과 고가의 장비 없이도 쉽고 편리하게 돼지열병을 진단 할 수 있으며 확보된 현장 조기진단/제어시스템을 통해 돼지열병 청정구역 실현과 양돈 수출증대 및 고부가가치 창출에 도움이 될 것으로 판단된다.

## SUMMARY

### I. Title

Development and Industrialization of Classical Swine Fever Diagnostic System

### II. Objectives & necessity

Classical swine fever virus (CSFV) is the causative agent of classical swine fever, the developed stockbreeding countries were declared free-CSF area through the complete prevention and early detection by the Office international des Epizooties(OIE) in 2009, however, it has been occurred continuously in Korea. To control outbreaks of the disease, infected and suspected herds are slaughtered, destroyed and quarantine restrictions are imposed. This can cause large economic losses and be depressed the pig industry. Newly developed diagnostic tools of CSFV will be extremely required to prevent the CSF disease in the field, moreover, rapid and precise detection system to distinguish between vaccinated and infected animals will be introduced urgently.

In this research, development of rapid and precise detection system for the CSFV will be settled based on the point-of-care testing (POCT).

### III. Point of research

To establish of rapid and precise detection system for the CSFV, three kinds of rapid detection kit were developed and would try to industrialize as follows.

First, development of CSFV antigene rapid detection kit was settled with CSFV E2 antibody to recognize E2 (gp55) antigen of CSFV.

Second, development of CSFV antibody rapid detection was settled with CSFV E2 antigen to recognize E2 (gp55) antibody of CSFV.

Third, development of CSFV Erns vaccine discrimination rapid detection kit was settled with CSFV Erns antigen to recognize Erns antibody of CSFV.

#### IV. Results

To develop and manufacture of CSFV antigen or antibody rapid detection kit, E2 (gp55) antigen or antibody of CSFV were selected and set up the suitable purification method. To develop and manufacture of CSFV-Erns vaccine discrimination rapid detection kit, Erns antigen was selected and set up the suitable purification method of it. Next, prototypes of the rapid detection kits which are based on the Lateral-flow immunoassay were developed and produced using those materials.

#### V. Outcomes & Applications

By settlement of rapid and sensitive diagnosis assay in the field, these results can contribute to effective countermeasure as a diagnostic tool for infectious CSF disease at an early stage. Furthermore, these rapid tests are designed so that even a technician with limited expertise and without expensive equipment can perform the test easily, and eventually the earned rapid accurate field diagnosis/control system will not only help to make clean area of CSF disease but it also be useful to rise in pork exports and to create high value-added industry.

## CONTENTS

Document for submission .....	1
Summary (Korean) .....	2
Summary (English) .....	4
Contents (English) .....	6
Contents (Korean) .....	10
Chapter 1. Introduction .....	13
Section 1. Objectives of research and development .....	13
Section 2. Necessity of research and development .....	13
가. Technical aspects .....	13
나. Economic and industrial aspects .....	14
Chapter 2. Present view of technology in domestic and foreign countries .....	16
Chapter 3. Perform research and development information and results .....	19
Section 1. Production of antigen or antibody .....	19
가. Construction of monoclonal CSFV-E2 antibody .....	19
나. Construction of CSFV-E2 antigen .....	20
다. Construction of CSFV-Erns antigen .....	23
Section 2. Selection of raw materials .....	27
가. Selection of effective anti-E2 antibody .....	27
나. Selection of effective recombinant E2 antigen .....	28

다.	Selection of effective recombinant Erns antigen .....	30
라.	Reference panels of CSFV-E2 antigen .....	31
마.	Reference panels of CSFV-E2 antibody .....	33
바.	Reference panels of CSFV-Erns antibody .....	35
Section 3.	Determination of the antigen or antibody concentration of the test strips .....	37
가.	Test strip of anti-E2 antibody .....	37
나.	Test strip of E2 antigen .....	39
다.	Test strip of Erns antigen .....	41
Section 4.	Determination of the concentration of antigen- or antibody-colloidal gold conjugate .....	43
가.	Antibody-colloidal gold conjugate for the CSFV-E2 antigen detection .....	43
나.	Antigen-Colloidal gold conjugate for the CSFV-E2 antibody detection .....	46
다.	Antigen-Colloidal gold conjugate for the CSFV-Erns antibody detection .....	48
Section 5.	Determination of cut-off value for the standard .....	50
가.	CSFV-E2 antigen test kit .....	50
나.	CSFV-E2 antibody test kit .....	51
다.	CSFV-Erns antibody test kit .....	53
Section 6.	Comparison of clinical results between ELISA and SenPERT test kits .....	56
가.	Result of CSFV-E2 antigen test kit .....	56



나. Result of CSFV-E2 antibody test kit .....	57
다. CSFV-Erns antibody test kit .....	58
Section 7. Summary of clinical trial .....	59
가. CSFV-E2 antigen test kit .....	59
나. CSFV-E2 antibody test kit .....	62
다. CSFV-Erns antibody test kit .....	65
Section 8. Result of ELISA .....	68
가. CSFV-E2 antigen test kit .....	69
나. CSFV-E2 antibody test kit .....	70
다. CSFV-Erns antibody test kit .....	72
Section 9. Evaluation of reproducibility .....	74
가. CSFV-E2 antigen test kit .....	74
나. CSFV-E2 antibody test kit .....	75
다. CSFV-Erns antibody test kit .....	76
Section 10. Evaluation of cross-reactivity .....	77
가. CSFV-E2 antigen test kit .....	77
나. CSFV-E2 antibody test kit .....	78
Chapter 4. Achievement and contribution .....	79
Section 1. Annual research goal and attainment upon evaluation points .....	79
Section 2. Contribution to the related fields .....	81
가. Technical aspect .....	81
나. Economic and industrial aspect .....	82
Chapter 5. Plans for the use of the results .....	83

A. Merchandising and commercialization strategy .....	83
B. Prototype development .....	83
C. Patent application .....	93
Chapter 6. References .....	94

# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
Summary .....	4
Contents (English) .....	6
Contents (Korean) .....	10
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	13
제 1 절 연구개발의 목적 .....	13
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	13
가. 기술적 측면 .....	13
나. 경제·산업적 측면 .....	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
제 1 절 원료 항체 / 항원의 제조 .....	19
가. 돼지열병바이러스 항원 진단용 단일클론항체 제작 .....	19
나. 돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 E2 항원의 제조 .....	20
다. 돼지열병바이러스 백신항체 감별진단을 위한 Erns 항원제조 .....	23
제 2 절 진단용 원료 물질의 선정 .....	27
가. 항 CSFV 유효항체의 선정 .....	27
나. 재조합 E2 유효항원의 선정 .....	28
다. 재조합 Erns 유효항원의 선정 .....	30

라. 돼지열병바이러스 항원 진단을 위한 표준시료 .....	31
마. 돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 표준시료 .....	33
바. 돼지열병바이러스 백신감별을 위한 표준시료 .....	35
제 3 절 검사 스트립상의 항원 / 항체 용량 설정 .....	37
가. 돼지열병바이러스 항원 진단용 스트립 .....	37
나. 돼지열병바이러스 항체 진단용 스트립 .....	39
다. 돼지열병바이러스 백신감별(Erns) 진단용 스트립 .....	41
제 4 절. 항체 / 항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양 설정 .....	43
가. 돼지열병바이러스 항원 진단용 .....	43
나. 돼지열병바이러스 항체 진단용 .....	46
다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단용 .....	48
제 5 절. 양성 표준검체 역가 기준 근거 .....	50
가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트 .....	50
나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트 .....	51
다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트 .....	53
제 6 절. 표준 방법론(ELISA)과의 비교 임상 결과 .....	56
가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트 .....	56
나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트 .....	57
다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트 .....	58
제 7 절. 임상시험 성적 요약 .....	59
가. 돼지열병바이러스 항원 진단 .....	59
나. 돼지열병바이러스 항체 진단 .....	62
다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단 .....	65

제 8 절. 표준법 ELISA 시험 결과 .....	68
가. 돼지열병바이러스 항원 시험 .....	69
나. 돼지열병바이러스 항체 시험 .....	70
다. 돼지열병바이러스 백신감별 시험 .....	72
제 9 절. 개발제품의 재현성검사 .....	74
가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트 .....	74
나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트 .....	75
다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트 .....	76
제 10 절. 개발제품의 교차반응검사 .....	77
가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트 .....	77
나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트 .....	78
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	79
제 1 절. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도 .....	79
제 2 절. 관련분야의 기술 발전에의 기여도 .....	81
가. 기술적 측면 .....	81
나. 경제·산업적 측면 .....	82
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	83
가. 상품화 및 사업화 전략 .....	83
나. 개발 시제품 .....	83
다. 특허출원 .....	93
제 6 장 참고문헌 .....	94

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

국내 돼지열병 박멸을 위해 현장에서 돼지열병바이러스를 신속하게 진단 할 수 있는 민감하고 특이적인 검사와 또한 야외강독 돼지열병 항체와 마커백신 접종 항체를 감별하기 위한 진단시스템 도입이 시급하다. 본 과제는 Lateral-flow immunoassay 기술<sup>(1)</sup>을 이용하여 돼지열병에 관한 조기진단과 제어시스템 확보 및 산업화를 위하여 돼지열병바이러스 1)항원진단, 2)항체진단 및 3)백신 감별을 위한 신속진단키트를 개발하고 이를 통하여 축산농가의 소득증대 및 국가 방역 사업에 이바지 하는 것을 목적으로 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

- 돼지열병의 신속 정확한 진단을 위해서는 **보다 민감하고 특이적인 검사가 필요함**. 특히 병돈 발생시 돈육의 수출 및 돼지열병 청정화 사업에 큰 지장을 초래하므로 지속적인 동물 감염원 통제 (animal reservoir control) 및 잠복감염의 조기 진단을 위해 **현장에서도 사용가능한 손쉬운 감시검사 또한 필수적임**.
- 종래 돼지열병에 대한 항체를 진단하는 방법으로 바이러스중화시험<sup>(2,3)</sup>, 효소면역항체를 이용한 엘라이자 (ELISA)<sup>(4)</sup> 및 라텍스 응집반응<sup>(5)</sup> 등을 사용하나 **이들 방법은 전문화된 인력 및 실험장비를 필요로 하며 진단시간도 길어 현장에서 사용하기는 부적합함**.
- 현재 돼지열병 약독 백신인 LOM 백신을<sup>(6,7)</sup> 사용하고 있으나 돼지열병 근절정책을 시행함에 따라 E2 단백질을 이용한 유전자 재조합 마커백신의<sup>(8,9)</sup> 산업화에

초점을 맞추고 있으며 향후에 사용될 수 있는 기반을 확립하고 있는 실정이나, 유전자 재조합 마커백신의 사용 시 **백신 항체와 야외감염 항체를 감별할 수 있는 검사법이 수립되지 않아 백신 사용 후 진단에 어려움이 있을 것으로 예상되어 야외강독 돼지열병 항체와 마커백신 접종 항체를 감별할 수 있는 키트의 개발이 요구됨.**

- 외국에서는 마커백신 접종 후 돼지열병 바이러스의 Erns 재조합 단백질을 이용하여 감별검사 하는 방법은 평가되어 있고 2개사 (CEDI사 및 CHECKIT)에서 키트가 개발되어 있으나, **바이러스 유전형의 다양성에 따라 검사결과의 불일치 가능성이 높은 것으로 보고되어 있음.**
- 따라서 **돼지열병 바이러스 질병의 통제를 위해서는 1형, 2형, 3형의 타입을 모두 진단할 수 있는 항원진단, 항체진단 및 백신 감별진단을 위한 진단시스템이 모두 도입되어야 함.**
- 신속진단 키트개발 시 반드시 필요한 골드 콜로이드 (Gold colloid) 합성, 이를 이용한 컨쥬게이션 (conjugation) 전반의 기술과 제작 역량 및 풍부한 임상 시험 경험을 토대로 적은 양의 임상 검체에서도 **신속하고 정확한 진단을 위한 높은 민감도, 특이도, 재현성을 실현, 신뢰성 있는 제품을 개발하고자 함.**

#### 나. 경제·산업적 측면

- 국립수의과학검역원에 따르면 최근 5년간의 돼지열병 발생 두수는 2004년 781두, 2005년 811두, 2006년 1074두, 2007년 58두 그리고 2008년에는 99두가 발생하는 등 꾸준히 발생.
- 한국육류유통수출입협회에서 발간된 식육편람에 따르면 일본의 돼지고기 수입은 1999년 약 92만톤에서 2007년 121만톤으로 약 30% 가량 증가하였으나 2000년 4월 **일본이 돼지열병 발생지역의 돼지 수입을 전면 금지함.**

- 따라서 우리나라 돼지고기 해외수출액은 1999년 3억4천 달러에서 2007년 2천 5백 달러로 오히려 93% 감소하여 국내 축산농가의 양돈 산업에 큰 타격을 주고 있음.
- 우리나라가 돼지열병 청정지역으로 인정될 경우, 돼지열병 발생지역으로부터의 돼지고기 수입을 금지할 수 있는 권리를 행사할 수 있어 값싸고 질이 떨어지는 돼지고기 수입으로 인한 돼지고기 가격 하락을 방지할 수 있어 돼지 농가의 수입 증대가 가능함.
- 병돈 발생 시 병돈 이외의 돼지에 대해서도 이동이 제한되는 등 양돈 농가만의 피해뿐만 아니라, 질병 발생 시 해당 지역의 비육돈의 수출 금지 및 병돈의 살 처분에 대한 보상금을 지원하는 등의 양돈 농가 및 국가재정의 손실 또한 발생 하며, 수출 감소로 인한 국내 돼지의 과잉공급으로 가격이 하락하게 되어 전반적인 양돈 산업의 침체가 발생함.
- 따라서 국내 돼지열병 바이러스 박멸을 위한 체계적인 백신 프로그램의 확립 및 진단시스템의 도입이 시급하다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 돼지 열병은 Flaviviridae과, Pestivirus속에 속하는 RNA 바이러스로 주로 감염 돼지의 분변, 오줌, 눈물, 콧물에 배출되는 바이러스로 감염되거나 사람이나 신발, 의복 및 기구 같은 기계적인 매개체로도 감염 됨<sup>(10)</sup>.
- 야생 멧돼지에서도 바이러스가 발견되므로 멧돼지 출몰지역은 발병 위험이 있음<sup>(11,12)</sup>.
- 감염시 급성형일 경우 고열, 피부발적, 식욕결핍, 변비, 설사, 백혈구 감소, 후구 마비, 폐사 등의 증상이 나타남<sup>(10)</sup>.
- 임신한 모돈 감염시 태반을 통해 태아에게 감염되며 일령에 따라 재흡수, 유산, 사산 등이 나타나고 분만되는 경우도 분만 수일 후 죽거나 위축돈이 됨<sup>(10)</sup>.
- 잠복기는 주로 6-11일이나 20-30일 (국제수역기구에 의하면 최대 40일)의 잠복기를 거치기도 하므로 임신증상이 나타나기 전 이동 시 전국으로 확산 가능하므로 조기에 진단하여 확산 방지가 중요함<sup>(13,14)</sup>.
- 2009년 현재 미국, 일본 등 선진 축산국의 경우 철저한 방역으로 돼지열병이 발생하지 않아 국제수역사무국으로부터 청정지역으로 선정되어 있지만 우리나라를 포함한 중국 등의 아시아 국가와 불가리아, 루마니아, 헝가리 등 일부 유럽에서도 발생하고 있음.
- 가축돈에서 돼지열병 감염이 발견되지 않은 일부 유럽 국가에도 야생 멧돼지에서 감염이 발견되는 등 돼지열병에 안전하지 않은 상태로 신속 진단도구가 필요함.
- 기존의 연구자들은 돼지열병을 진단하는 방법으로 PCR이나 ELISA을

이용하였다 (표1). 이러한 방법은 전문화된 인력이나 고가의 장비를 요구하며, 진단 시간이 길기 때문에 현장에서 신속한 진단을 위해서는 적합하지 않다.

표 1. 기존 돼지열병 진단법

적용방법	제품
PCR	CSFV rRT-PCR (VetAlert™)
	CSFV real-time RT-PCR (VIROTYPE® CSFV)
	Swine Fever Virus (HCV/CSFV) PCR (Sinosource Biopharmaceutical)
ELISA	CSFV Ab ELISA test kit (Alibaba)
	CSFV Ab ELISA test kit (HuaYang)
	CSFV Ab ELISA test kit (anheal)
	Anti-Swine fever virus antibody ELISA kit(Zhejiang)
	HerdChek* Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kits (IDEXX)
	PrioCHECK® CSFV Ag (PRIONICS)
	Classical Swine Fever Virus (CSFV) Antigen ELISA (JENO BIOTECH)
	Classical Swine Fever Virus (CSFV) Antigen ELISA Kit (VDPro®)

- 현재 우리나라의 경우 돼지열병 순화 생독 바이러스인 LOM 균주를 생독 백신으로서 예방접종을 실시하고 있으나 외국에서는 이미 제한적인 상황에서 Erns 항원이 없는 마커백신의 사용이 권장되고 있음<sup>(15)</sup>. 이에 백신 항체와 야외강독 바이러스 감별키트가 2개사(CEDI사 및 CHECKIT)에서 개발되어 사용되고 있으나 바이러스 유전형에 따라 일정하지 않은 검사결과를 나타내는 것으로 보고되어 있어 다양한 유전형에 높은 민감도를 나타내는 키트의 개발이 요구됨.
- 본 연구팀은 수년간 바이러스나 박테리아에 의해 반려동물과 소동물들에게 발생

하는 질병을 Lateral flow immunoassay를 통해 membrane 상에서 면역 반응을 유도함으로써 신속하고 정확한 진단 결과를 얻을 수 있는 연구와 이를 통하여 다양한 질병과 관련된 진단 키트를 상용화해 왔으며 이렇게 축적된 연구기반과 기술력을 바탕으로 돼지열병에 대한 신속 진단 키트를 개발하고 산업화 하고자 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 원료 항체/항원의 제조

#### 가. 돼지열병 바이러스 항원 진단용 단일클론항체 제작

0.001% Binaryethyleneimine (BEL, Sigma)을 처리하여 불활화가 확인된  $10^7$ TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 역가 (LOM 주)를 갖는 돼지신장세포 (PK-15, ATCC CRL-1542) 배양 상층액을 항원 단백질로 사용하여, incomplete adjuvant (Gibco BRL) 와 동량으로 혼합한 다음 BALB/C(암컷, 5주령) 마우스의 뒷다리 발바닥에 100 ul씩 주사하였다. 면역 2주후 서혜임파절 (inguinal lymph node)로부터 lymph 세포를 분리하여 PEG1500 (Sigma)을 혼합하여 SP2/O-Ag14 (ATCC CRL-1581)과 세포융합 하였다. 돼지열병 바이러스에 특이적으로 반응하는 단일클론항체의 선별은 ELISA로 확인하였다. 돼지열병 바이러스가 포함된 배지 상층액을 96well plate에 부착 후 융합세포가 분비한 세포상층액을 반응액으로 사용하였으며, 항-마우스 IgG HRP를 가하여 반응시킨 뒤, TMB solution으로 발색시켜 돼지열병 바이러스와 특이적으로 반응하는 단일클론항체를 선별하였다. 선별된 단일클론항체를 생산하는 세포주 (CSFV-LOM 2)를 배양하여 프리스텐 (sigma사)으로 프라이밍 (priming)한 BALB/C (암컷, 10 주령) 마우스의 복강내에  $1 \times 10^6$ 세포/ml의 농도로 0.5ml 주입하고 마우스의 복강내에 복수가 생성되면 채취하였다. 수확한 복수를 10,000xg로 10분간 원심분리하고 상층액을 수확하여 이를 진단용 단일클론항체로 사용하였다. 단일클론항체는 면역친화성 크로마토그래피 (immunoaffinity chromatography) 법을 사용하여 정제하였다. 즉, 단백질(Protein) A/G가 콘주게이션 되어있는 아가로스 비드 (Bio-Rad)를 칼럼에 충전 한 다음 복수에서 채취된 단일클론항체를 첨가한다. 단백질 A-아가로스 비드에 부착된 단일클론항체를 용출완충액 (100mM glycine PH 3.0)을 사용하여 용출시킴으로써 순수한 단일클론항체를 분리한 다음 PBS에 투석 후, 0.02% NaN<sub>3</sub>를 첨가하여 4 °C에 보관하였다.

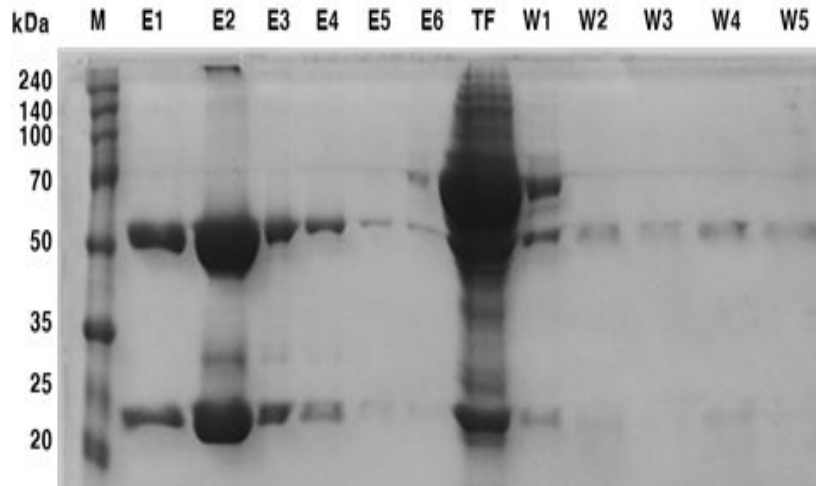


그림 1. 돼지열병바이러스 E2 항체의 정제. E1: Elution 1, E2: Elution 2, E3: Elution 3, E4: Elution 4, E5: Elution 5, E6: Elution 6, TF: ThroughFlow, W1: Wash 1, W2: Wash 2, W3: Wash 3, W4: Wash 4, W5: Wash 5.

#### 나. 돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 E2 항원의 제조

돼지열병바이러스 ALD주의 E2 유전자를 클로닝 하기 위하여 특정한 제한효소 인식 부위 (BamH I)를 포함하는 forward primer로서 5'-GGATCCCCGCCTA GCCTGCAAGGAAGAT-3'과 reverse primer로서 5'-GGATCCTTCTGCGAAGT AATCTGA-3'를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 증폭된 유전자를 전기영동 하여 1021 bp 길이의 DNA 단편을 분리한 다음 pGem-T Easy 벡터 (Promega) 및 Baculovirus 트랜스퍼 벡터인 pAcGP67B (BD Pharmingen)에 클로닝하여 pAcGP67BE2TNALD를 제작했다. pAcGP67B plasmid DNA는 하나의 polh 프로모터 하위에 histidine (His)를 삽입한 것으로 반대방향으로 존재하는 pohI 프로모터 하위에 E2 유전자를 삽입하였다. pAcGP67BE2TNALD와 베쿨로바이러스 DNA (BD Pharmingen)를 곤충세포 Sf21 (Invitrogen)에 공형질감염 (cotransfection)시켜 E2 단백질을 발현하는 유전자 재조합 베쿨로바이러스 BacE2TNALD를 제작하였다.



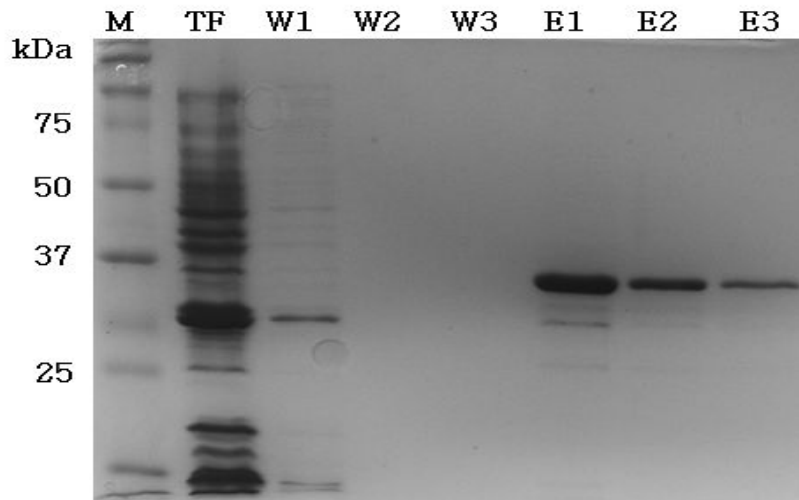


그림 3. 돼지열병바이러스 E2항원의 정제. TF : Through Flow, W1 : Wash 1, W2 : Wash 2, W3 : Wash 3, E1 : Elution 1, E2 : Elution 2, E3 : Elution 3.

정제된 재조합 E2 단백질은 SDS-PAGE 후 Coomassie blue R-250 (Sigma)로 염색하여 젤상에서 확인하였으며, 또한 Nitrocellulose membrane (Invitrogen)에 트랜스퍼하여 블롯팅을 수행하였다. 멤브레인은 1/3000 희석된 anti-His 항체와 1/5000 희석된 anti-mouse IgG-HRP를 가지고 블롯팅을 수행한 뒤 정제된 단백질의 크기와 발현을 확인하였다. 정제가 확인된 단백질은 0.1 M PBS에서 dialysis 후, 단백질을 BCA로 정량하여 키트 제작에 사용하였다.

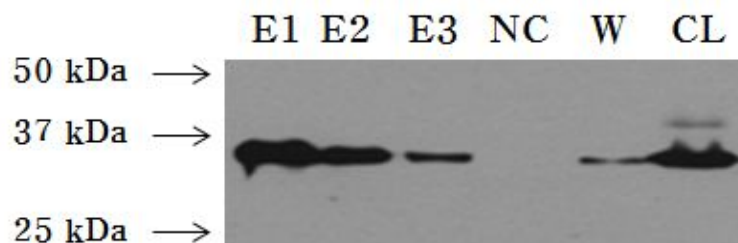


그림 4. 정제된 E2 항원에 대한 western blot. E1: Elution 1, E2: Elution 2, E3: Elution 3, NC: Negative control, W:Wash, CL: Crude lysate.

## 다. 돼지열병바이러스 백신항체 감별진단을 위한 Erns 항원 제조

돼지열병바이러스의 ERNS 구조단백질로부터 중요한 유효항원의 재조합 단백질을 제작하기 위해 바이오인포매틱스 분석 기술을 기반으로 돼지열병바이러스의 아미노산 서열을 분석하여 최적의 유효 항원의 표적을 선정하였다 (그림 5). 그림 5에서, 유효항원 분석을 위해 Erns 항원 단백질에 대한 아미노산 시퀀스는 폴리비리데 페스티바이러스 (Flaviviridae, Pestivirus)에 속하는 소 바이러스성 설사증 바이러스 (Bovine viral diarrhea virus, KD26-1)와 돼지열병바이러스 백신용 LOM주, 그리고 SW03 주를 사용하였다. 타겟 유전자의 번역 (translation) 산물의 막투과 절편 (transmembrane segment) 존재여부의 분석을 통해 막투과 절편 부의 배제를 위한 아미노산 서열을 분석한 결과 1-26 번째까지의 총 26 개의 아미노산이 막투과 단백질로 분석 되었다. Erns의 유효항원의 설계는 막투과 절편을 제외하고 3종의 바이러스 주로부터 공통으로 존재하는 antigenic peptide와 아미노산 서열의 프로파일을 분석하여 유효 타겟 항원 domain (candidate 1, 2, 그리고 3)을 부분적으로 채택하여 단백질의 항원성 및 용해성 (수용성)을 극대화 할 수 있도록 최종적으로 설계하였다.



IV		
BVDV(KD26-1)_AA.	EKALLAWAI ITIVLFLQVTMGENITQWNLQDNGTEGIQRAM	40
LOM_AA, SEQ	EKALLAWAvIaImLyQpveaENITQWNLsDNGTrGvQhAM	40
SWO3_AA, SEQ	EKALLAWAvITIVLyQpvaaENITQWNLsDNGTsGIQqAM	40
Consensus	ekallawa i i l q enitqwnl dngt g q am	
BVDV(KD26-1)_AA.	FQRGVMRSLHGIWPEKICTGVPSHLATDMELKTIHGMMDA	80
LOM_AA, SEQ	yIRGisRSLHGIWPEKICKGVPtyLATDtELKeIqGMMDA	80
SWO3_AA, SEQ	yIRGVMRSLHGIWPEKICKGVPtHLATDtELteIrGMMDA	80
Consensus	rg rslhgiwpekic gvp latd el i gmmda	
BVDV(KD26-1)_AA.	SEKTNYTCCRLQRHEWKNHGWCNWWYNI EPWILVMNRTQAN	120
LOM_AA, SEQ	SEgTNYTCCkLQRHEWKNHGWCNWWYNI dPW Iq l MNRTQAN	120
SWO3_AA, SEQ	SErTNYTCCRLQRHEWKNHGWCNWWYNI dPW Iq l MNRTQAN	120
Consensus	se tnyttcc rlrhewknhgwcnwwyni pwi mmrtqan	
BVDV(KD26-1)_AA.	LTEGQPPRECAVTCRYDRDSDLNVVTQARD SPTLLTGCKK	160
LOM_AA, SEQ	LaEGpPakECAVTCRYDkhaDyNVVTQARnrPTtLTGCKK	160
SWO3_AA, SEQ	LTEGpPekECAVTCRYDkntDvNVVTQARnrPTtLTGCKK	160
Consensus	l eg p ecavtcryd d mvvtqar pt ltgckk	
Candidate 1      Candidate 2		
BVDV(KD26-1)_AA.	GKNFSFAGILTRGPNFEIAASDVLFKHDCTSMFQDTAH	200
LOM_AA, SEQ	GKNFSFAGtvieGPCNFvsvveDiLygdHeCgSllQDTAl	200
SWO3_AA, SEQ	GKNFSFAGtvieGPCNFvsvveDiLygdHeCgSIFQDTAl	200
Consensus	gknfsfag gpcnf d l h c s qdta	
Candidate 3		
BVDV(KD26-1)_AA.	YLVDGMTNSLENARCGTAKLTTWLGKQLGILGKLENKSK	240
LOM_AA, SEQ	YLVDGMTNt i ENARCGaArvTsWLGrQLrIaGrrLEgrSK	240
SWO3_AA, SEQ	YLVDGMTNt i EkARCGaArvTsWLGrQLst tGKKLErgSK	240
Consensus	ylvdgmtn e arcg a t wlg ql g le sk	
BVDV(KD26-1)_AA.	TWFGA	245
LOM_AA, SEQ	TWFGA	245
SWO3_AA, SEQ	TWFGA	245
Consensus	twfga	

그림 5. Erns 유효항원부위 선정

이를 토대로 354 bp의 Erns 항원 서열을 대장균에서 발현시키기 위해 발현 벡터에 삽입시켜 pET23a(+) Erns를 제작하였으며, 이를 대장균에 형질전환

(transformation) 시켰다 (그림 6). 대장균 클론의 종균들을 0.5mM IPTG (isopropylthiogalactoside)로 25℃에서 밤새 배양하여 재조합 Erns 항원 단백질을 용출시켰다. Erns 항원 단백질을 용출하기 위해 FPLC (Bio-Rad, BioLogic DuoFlow Standard System) 장비를 이용하였다. Affinity chromatography 방법 중에 하나인 Ni-NTA His bind resin (Bio-Rad)을 사용하여 두 종류의 buffer를 gradient 방법을 사용하여 단백질을 정제하였다. (buffer A : 8M Urea, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 5mM Imidazole, pH8.0, buffer B : 8M Urea, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM Imidazole, pH8.0) (그림 7).

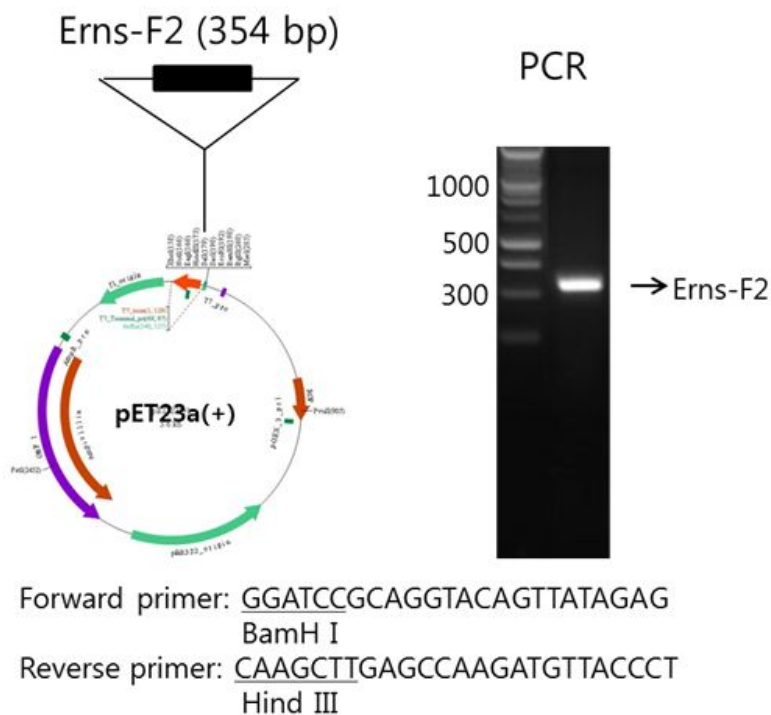


그림 6. Erns 항원 클로닝

정제된 재조합 Erns 단백질은 SDS-PAGE 후 Coomassie blue R-250 (Sigma)로 염색하여 젤상에서 발현 및 정제여부를 확인하였다.

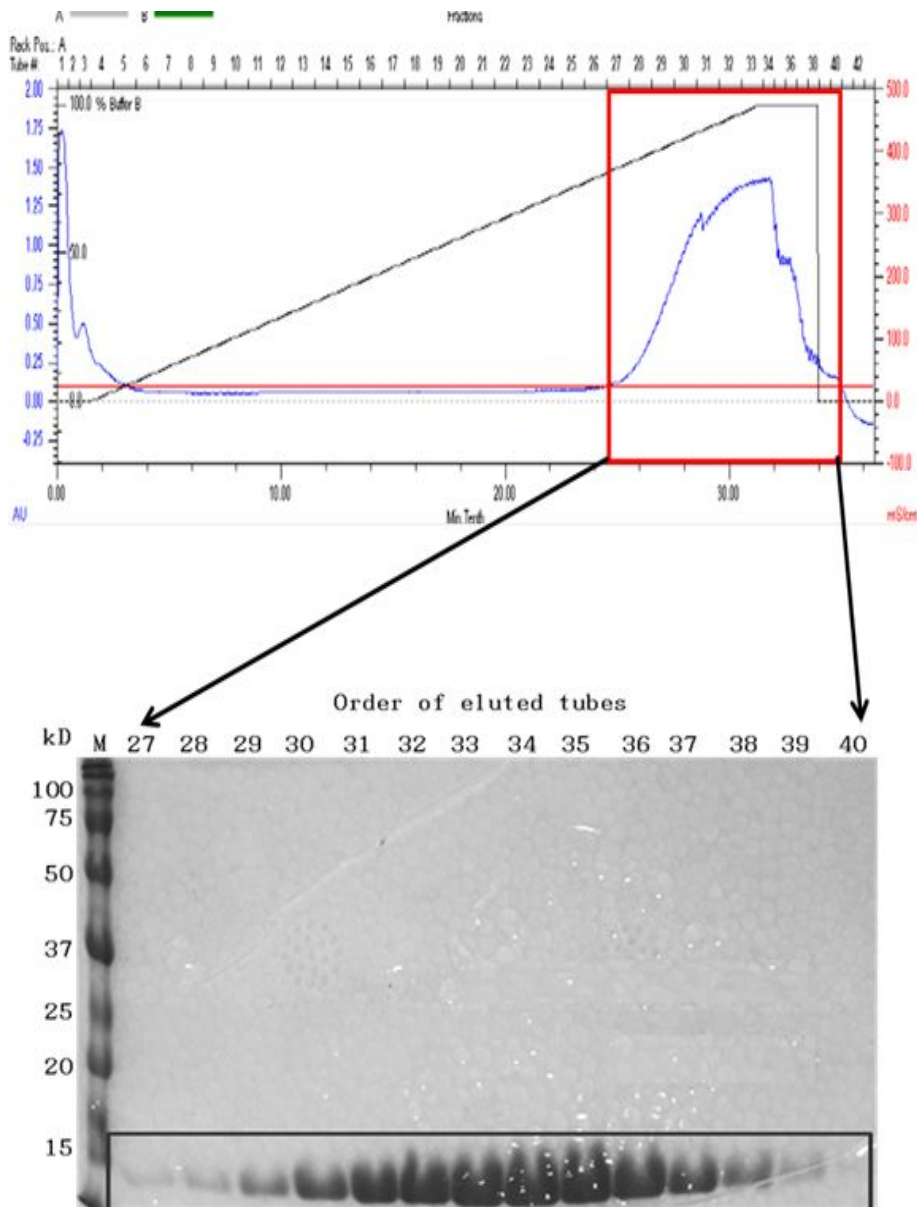


그림 7. 돼지열병바이러스 Erns 항원의 정제. Lane 1: Marker (M), Lane 2-15: Order of eluted tubes from FPLC (27-40)

또한 Nitrocellulose membrane (Invitrogen)에 트랜스퍼하여 블롯팅을 수행하였다. 멤브레인은 1/3000 희석된 anti-His 항체와 1/5000 희석된 anti-mouse IgG-HRP를 가지고 블롯팅을 수행한 뒤 정제된 단백질의 크기와 발현을 확인하였다.

다. 정제가 확인된 단백질을 0.1 M PBS에서 투석 후, 단백질을 BCA로 정량하여 4°C 에 보관하였으며, 보레이트완충액 (2mM sodium tetraborate, pH9.0)에 투석하여 키트 제작에 사용하였다.

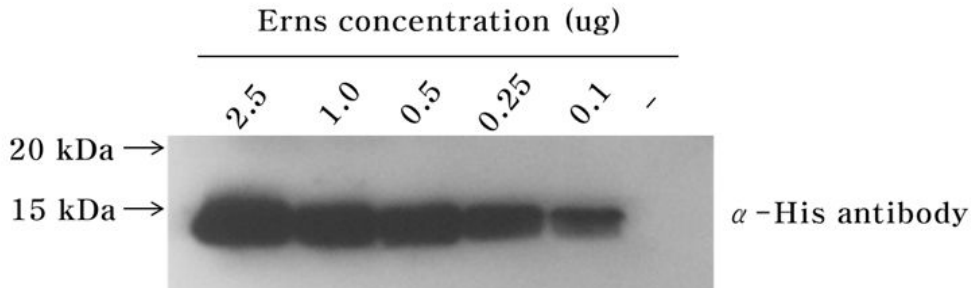


그림 8. 정제된 Erns 항원에 대한 농도별 western blot

## 제 2 절 진단용 원료물질의 선정

### 가. 항 돼지열병바이러스 유효항체의 선정

유효항체를 선별하기 위해 direct ELISA를 통한 항체 친화성 분석(antibody affinity)을 수행하였다. 재조합 E2 항원을 마이크로 플레이트에 50 ng/Well 농도로 고정화(코팅)한 후 역가를 비교하기 위해 각 단일클론 anti-CSFV E2 항체 (CSFV-M1, M2, 그리고 M3) 0, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000(ng/ml) 농도로 희석하여 반응하고, anti-mouse IgG HRP (1:5,000) 으로 확인하여 각 단일클론 항체의 친화성을 분석하였다.

그림 9 에서, 항원 친화도 시험 결과, CSFV-M1과 M2의 경우 M3보다 뚜렷한 농도별 민감도 증가를 볼 수 있었다. 따라서 돼지열병바이러스 항원 진단 키트 개발을 위해 CSFV-M1 항체 및 CSFV-M2 항체를 채택하여 사용하였다.

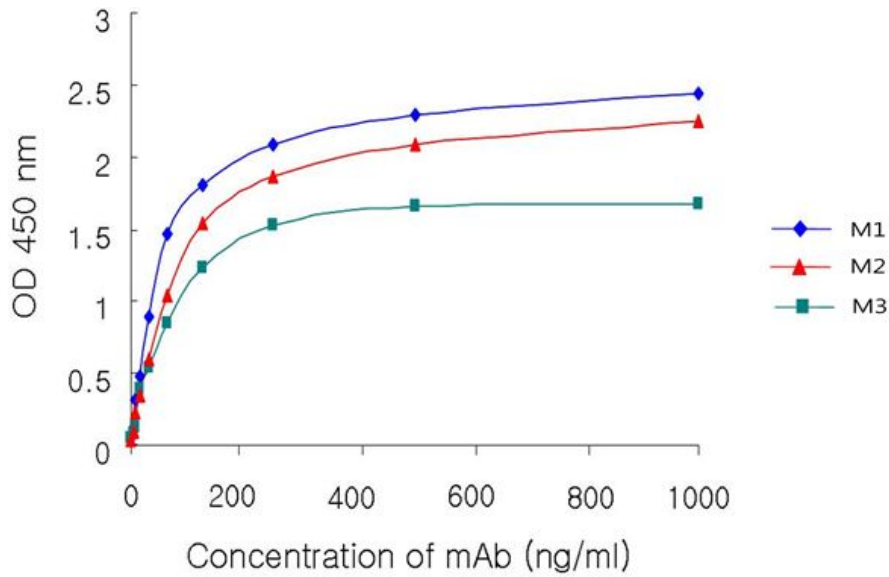


그림 9. Direct ELISA를 이용한 항 돼지열병바이러스 역가확인

#### 나. 재조합 E2 유효항원의 선정

재조합 E2 단백질을 나이트로셀룰로오즈 멤브레인에 96공 도트 매니폴드(96-well hybrid-dot manifold, GibcoBRL, Gaithersburg, MO)를 이용하여 흡착시켰다. 그 후 blocking solution (5 % nonfatmilk-PBS solution)으로 상온에서 1 시간이상 blocking을 수행 비특이 반응을 억제시켰다. 2 % BSA-PBS solution에 1/50 비율로 희석한 CSFV 항체양성 표준검체를 상온에서 2 시간 동안 천천히 shaking하여 반응시켰다. 검체가 반응한 멤브레인은 TBST buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 10 분씩 3번 membrane을 씻어 비특이적으로 결합한 검체내 물질을 제거한 뒤, HRP (houseradish peroxidase)-conjugated anti-swine IgG secondary antibody (5% nonfatmilk-TBST로 1/2000 배율로 희석)를 상온에서 1 시간 shaking 하면서 반응 시킨 후, TBST buffer로 10분씩 5회 membrane을 씻어주었다. 최종적으로 membrane은 Chemiluminescence Luminol reagent (GE Healthcare)와 상온에서 1분간 반응시킨 후 X-ray film (FUJIFILM )에 30 초~4 분간 감광시켰다



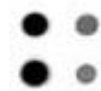
재조합 항원	Specimen 1	Specimen 2	Specimen 3
CSFV E2			

그림 10. 재조합 E2 단백질의 dot-Immunoassay를 통한 항원성 검사

그림 10에서, 재조합 E2 항원은 3종류의 양성 표준검체에서 반응성을 확인할 수 있었다. 따라서, 3 종류의 검체에 모두 강하게 반응하는 재조합 E2 항원을 원료 물질로 사용가능한 것을 확인하였다.

또한, 추가적으로 유효항원 선별 및 친화력을 분석하기 위해 direct ELISA를 수행하였다. 적정 농도로 혼합한 재조합 E2 항원을 마이크로 플레이트에 0, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000 (ng/ml) 농도로 희석하여 고정화(코팅)한 후 역가를 비교하기 위해 돼지열병 바이러스 혈청형 LOM, ALD 및 NS를 접종한 후 확보한 시료 혈청을 이용하여 항원 친화성을 확인하였다.

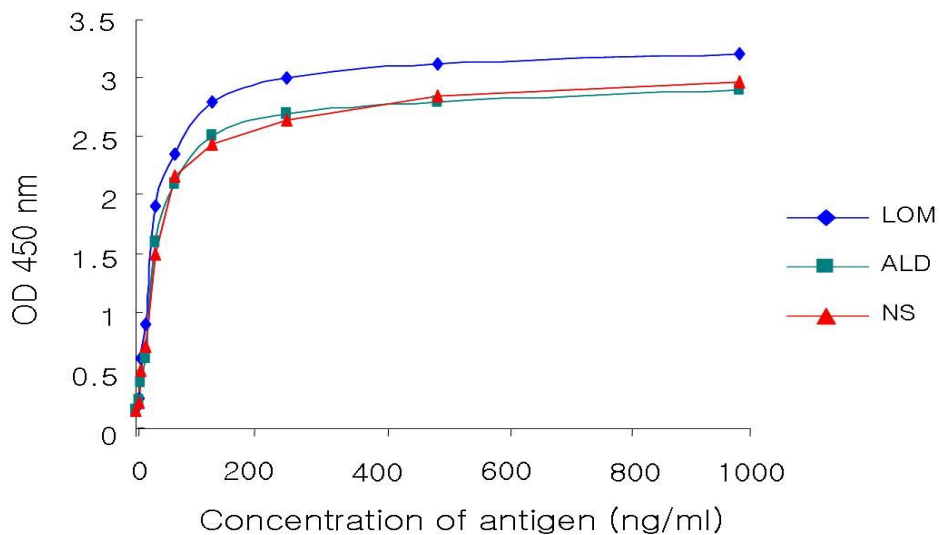


그림 11. Direct ELISA를 이용한 돼지열병 E2항원의 혈청그룹별 친화도 분석

그림 11에서, Direct ELISA 결과 3 종의 바이러스를 접종한 돼지혈청에서는 모두 반응하는 것으로 확인되었다. 따라서 본 항원은 혈청그룹별 균주의 바이러스에 반응성이 우수하여 항체진단을 위한 원료 항원으로 사용하였다.

#### 다. 재조합 Erns 유효항원의 선정

재조합 Erns 단백질을 나이트로셀룰로오즈 멤브레인에 96공 도트 매니폴드 (96-well hybrid-dot manifold, GibcoBRL, Gaithersburg, MO)를 이용하여 흡착시켰다. 그후 blocking solution (5 % nonfatmilk-PBS solution)으로 상온에서 1시간이상 blocking을 수행 비특이 반응을 억제시켰다. 2 % BSA-PBS solution에 1/50 비율로 희석한 CSFV-Erns 항체 양성 검체를 상온에서 2 시간 동안 천천히 shaking하여 반응시켰다. 검체가 반응한 멤브레인은 TBST buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 10 분씩 3번 membrane을 씻어 비특이적으로 결합한 검체내 물질을 제거한 뒤, HRP (houseradish peroxidase)-conjugated anti-swine IgG secondary antibody (5% nonfatmilk-TBST 로 1/2000 배율로 희석) 를 상온에서 1 시간 shaking 하면서 반응 시킨 후, TBST buffer로 10분씩 5회 membrane을 씻어주었다. 최종적으로 membrane은 Chemiluminescence Luminol reagent (GE Heathcare)와 상온에서 1분간 반응 시킨 후 X-ray film (FUJIFILM ) 에 30 초~4 분간 감광시켰다




재조합 항원	Specimen 1	Specimen 2	Specimen 3
Erns			

그림 12. 재조합 Erns 단백질의 dot-Immunoassay를 통한 항원성 검사



그림 12에서, 재조합 Erns 항원은 3종류의 양성 검체에서 반응성을 확인할 수 있었다. 따라서, 3 종류의 검체에 모두 강하게 반응하는 재조합 Erns 항원을 원료 물질로 사용가능한 것을 확인 하였다.

또한, 추가적으로 유효항원 선별 및 친화력을 분석하기 위해 direct ELISA를 수행하였다. 적정 농도로 혼합한 재조합 Erns 항원을 마이크로 플레이트에 0, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1000 (ng/ml) 농도로 희석하여 고정화(코팅)한 후 역가를 비교하기 위해 CSFV-Erns 항체 양성 검체 (SP1, SP2, SP3)와 음성 검체 (SN)를 이용하여 항원 친화성을 확인하였다.

그림 13에서, Direct ELISA 결과 CSFV-Erns 항체 음성 검체에서는 반응이 나타나지 않았으나 3 종의 양성 검체에서는 모두 반응하는 것으로 확인되었다. 결론적으로, dot-Immunoassay를 통한 항원성 검사와 Direct ELISA를 이용한 돼지열병 Erns 항원의 친화도 분석을 통해 Erns 항원을 백신감별 진단키트를 위한 원료항원으로 사용하였다.

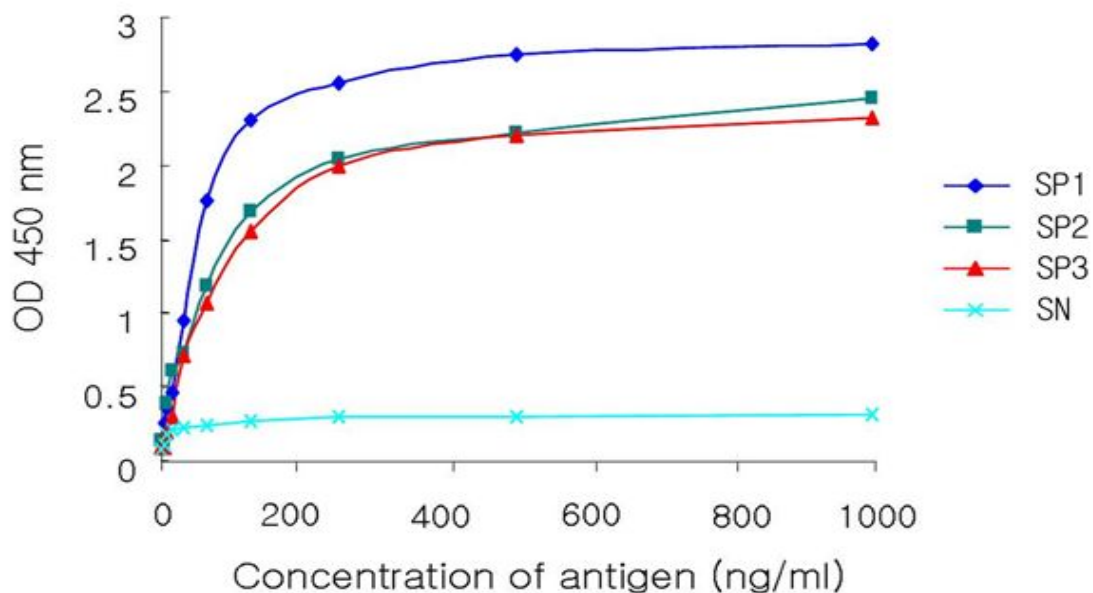


그림 13. Direct ELISA를 이용한 돼지열병 Erns 항원의 친화도 분석

라. 돼지열병바이러스 항원 진단을 위한 표준시료



돼지열병바이러스 항원 진단을 위한 표준 시료는 (주) 제노바이오텍으로부터 제공 받았으며 돼지열병 바이러스 항원 ELISA 키트 (CSFV-Ag, VDpro CSFV Antigen ELISA kit, Jenobiotech) 를 이용하여 양성표준 검체의 기준을 설정 하였다. 돼지열병바이러스의 E2 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 흡착시킨 플레이트에 제공 받은 표준 시료를 완충액으로 처리한 후 플레이트에 첨가하고 37°C에서 90 분 동안 반응 하였다. 시료의 반응이 완료된 플레이트는 washing solution을 이용하여 5회 반복하여 세척하고 신호 증폭과 발색 반응을 위해서 secondary antibody인 HRPO Anti-CSFV Conjugate를 첨가 후 상온에서 1시간동안 반응하고 세척 과정을 거친 후, TMB Substrate로 발색반응을 유도하고 Stop solution (2M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 으로 반응을 정지한 후 ELISA reager 450 nm 파장 흡광도로 측정하여 분석하였다 (표 2). ELISA 값에 대한 결과 판정은 가검 시료의 % S/P 값을 계산하여 판정하였다. 판정 기준은 (%) S/P 값이 15 미만일 경우 음성, 15 이상 20 미만일 경우 위양성, 그리고 20 이상일 경우 양성으로 하였다 {(%) S/P = (가검시료 평균 흡광도- 음성대조 평균흡광도)/CPC (Corrected Positive Control) X 100, CPC = 양성대조 평균흡광도 - 음성대조 평균흡광도}.

표 2. E2 항원진단을 위한 ELISA 법의 표준시료 측정 값

No	Titer (log10)	OD	SD	% S/P	비고
1	6.0	2.760	0.15	99	양성
2	5.7	2.558	0.09	91	양성
3	5.4	2.445	0.44	87	양성
4	5.1	2.357	0.30	83	양성
5	4.8	1.613	0.26	55	양성
6	4.5	1.108	0.01	35	양성
7	4.2	0.593	0.08	16	위양성
8	3.9	0.338	0.07	6	음성
9	3.6	0.192	0.00	0.8	음성
10	3.3	0.147	0.01	-	음성
PC		2.780	0.10	100	양성
NC		0.169	0.01	0	음성

OD: Optical density, SD: Standard deviation, PC: Positive control, NC: Negative control, % S/P: Sample to positive ratio

표 2에서, ELISA 결과 제공 받은 10개의 돼지열병바이러스 항원 진단을 위한 표준시료에서 O.D 값과 (%) S/P 값에 따라 음성 (O.D 0.539 이하), 저역가 (OD 1.108 ~ 1.613), 중역가 (OD 2.357 ~ 2.445), 고역가 (OD 2.558 이상) 로 돼지열병 바이러스 항원 진단용 키트를 위한 표준시료의 기준을 설정할 수 있었다. 또한 E2 항체의 항원 진단한계는 시험결과  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 으로 확인하였다.

#### 마. 돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 표준시료

돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 표준 시료는 검역원으로부터 제공 받았으

며, 제공받은 시료는 5'NCR RT-PCR 방법을 통해서 NCR 부위(421bp)를 증폭시  
 킨 뒤 XhoI 제한 효소를 처리하여 절단 되지 않는 것을 확인하였으며, 이를 통해  
 검체에서 생성된 항체가 백신주에 의해서 생성된 것으로 파악되었다. 돼지열병바  
 이러스 항체검사용 ELISA 키트 (CSFV-Ab, VDpro CSFV Antibody ELISA kit,  
 Jenobiotech)를 이용하여 양성표준 검체의 기준을 설정 하였다. 돼지열병바이러스  
 의 E2 antibody에 특이적으로 반응하는 gp55 항원을 흡착시킨 플레이트에 제공  
 받은 표준 시료를 완충액으로 처리한 후 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 동  
 안 반응 하였다. 시료의 반응이 완료된 플레이트는 washing solution을 이용하여  
 5회 반복하여 세척하고 신호 증폭과 발색 반응을 위해서 secondary antibody인  
 HRPO Anti-Swine Conjugate를 첨가 후 상온에서 1시간동안 반응하고 세척 과정  
 을 거친 후, TMB Substrate로 발색반응을 유도하고 Stop solution (2M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
 으로 반응을 정지한 후 ELISA reager 450 nm 파장 흡광도로 측정 하여 분석하였  
 다 (표 3). ELISA 값에 대한 결과 판정은 가검 시료의 % S/P 값을 계산하여 판  
 정하였다. 판정 기준은 (%) S/P 값이 15 미만일 경우 음성, 15 이상 20 미만일  
 경우 위양성, 그리고 20 이상일 경우 양성으로 하였다 {(%) S/P = (가검시료 평  
 균 흡광도- 음성대조 평균흡광도)/CPC (Corrected Positive  
 Control) X 100, CPC = 양성대조 평균흡광도 - 음성대조 평균흡광도}.

표 3. E2 항체진단을 위한 ELISA 법의 표준시료 측정 값

No	Titer (VN titer)	OD	SD	% S/P	비고
1	128	1.035	0.08	66	양성
2	64	0.771	0.13	46	양성
3	32	0.490	0.07	24	양성
4	16	0.341	0.02	13	음성
5	8	0.218	0.02	3	음성
6	4	0.166	0.01	-	음성
7	2	0.134	0.01	-	음성
8	1	0.121	0.01	-	음성
PC		1.472	0.01	100	양성
NC		0.167	0.02	0	음성

OD: Optical density, SD: Stendard deviation, PC: Positiv control, NC: Negative control, % S/P: Sample to positive ratio

표 3에서, ELISA 결과 검역원으로부터 제공 받은 돼지열병바이러스 1024배 중화 항체 표준시료를 serial dilution 하여 얻은 8종에 대해 O.D 값에 따라 시료의 기준을 저역가 (OD 0.45 ~ 0.49), 중역가 (OD 0.71 ~ 0.77), 고역가 (OD 1.0 이상) 로 구성하여 일정한 제품을 위한 양성 표준시료의 기준을 설정할 수 있었다. 따라서, E2 (gp55) 항원의 항체 진단범위는 32배 중화 항체역가까지로 확인되었다.

#### 바. 돼지열병바이러스 백신감별을 위한 양성시료

돼지열병바이러스 백신감별을 위한 표준시료로는 돼지열병바이러스의 Erns 항체가 포함되어 있는 mouse로부터 얻은 항혈청을 사용하였다. 양성시료로 쓰인 Erns 항혈청은 정제된 재조합 Erns 항원을 6주령 mouse에 Freund'

adjuvant와 혼합하여 6주 동안 2주마다 3회 면역을 시켰으며, 마지막 면역 4일 후 채취되었다. 채취된 항혈청은 PBS buffer에 serial dilution 한 후 다음과 같이 ELISA를 실시하였다. 돼지열병바이러스의 Erns antibody에 특이적으로 반응하는 Erns 항원을 흡착시킨 플레이트에 채취한 표준 시료를 완충액으로 처리한 후 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응 하였다. 시료의 반응이 완료된 플레이트는 washing solution을 이용하여 5회 반복하여 세척하고 신호 증폭과 발색 반응을 위해서 secondary antibody인 Anti-mouse IgG HRP Conjugate를 첨가 후 상온에서 1시간동안 반응하고 세척 과정을 거친 후, TMB Substrate로 발색반응을 유도하고 Stop solution (2M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 으로 반응을 정지한 후 ELISA reader 450nm 파장 흡광도로 측정 하여 분석하였다 (표 3). ELISA 값에 대한 결과 판정은 가검 시료의 % S/P 값을 계산하여 판정하였다. 판정 기준은 (%) S/P 값이 15 미만일 경우 음성, 15 이상 20 미만일 경우 위양성, 그리고 20 이상일 경우 양성으로 하였다 {(%) S/P = (가검시료 평균 흡광도- 음성대조 평균흡광도)/CPC X 100, CPC = 양성대조 평균흡광도 - 음성대조 평균흡광도}.

표 4. Erns 항체진단을 위한 ELISA 법의 양성시료 측정 값

No	Titer (Dilution <sup>-1</sup> )	OD	SD	% S/P	비고
1	2	2.64	0.21	96	양성
2	4	2.58	0.16	94	양성
3	8	2.45	0.17	88	양성
4	16	2.32	0.22	83	양성
5	32	2.15	0.17	76	양성
6	64	1.70	0.18	57	양성
7	128	1.23	0.09	37	양성
8	256	0.61	0.32	11	음성
PC		2.73	0.21	100	양성
NC		0.36	0.07	0	음성

OD: Optical density, SD: Standard deviation, PC: Positive control, NC: Negative control, % S/P: Sample to positive ratio

표4에서, ELISA 결과 Erns 항혈청 시료를 serial dilution 하여 얻은 8종에 대해 O.D 값에 따라 시료의 기준을 저역가 (OD 1.75이하), 중역가 (OD 1.92~2.05), 고역가 (OD 2.1 이상) 로 구성하여 일정한 제품을 위한 양성 검체의 기준을 설정할 수 있었다. 따라서, Erns 항원의 항체 진단범위는 128<sup>-1</sup> serial dilution 한 항혈청까지로 확인되었다.

### 제 3 절 검사 스트립상의 항원/항체 용량 설정

#### 가. 돼지열병바이러스 항원 진단용 스트립

##### A. 시험 방법

항-돼지열병바이러스 다클론 항체를 각각 0.18, 0.27, 0.36, 0.45 $\mu$ g/strip의 양이 되도록 정성분석 멤브레인의 검사선 위치에 흡착시키고 각각을 조립하고, 검체 40 $\mu$ l와 검액 40 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주한 후 15분에 판정한다.

B. 시험 결과 (표 5 및 그림 14)

- 음성 검액은 시간의 변화에 관계없이 검사선에서 발색을 나타내지 않는다.
- 양성 검액의 경우 0.18, 0.27 $\mu$ g/strip에서는 전체적으로 발색이 약하며 특히 저역가에서 발색 강도가 현저히 떨어져 음·양성 판정이 어렵다.
- 0.36, 0.45 $\mu$ g/strip에서는 저역가 (Titer 4.5, OD 1.108), 중역가 (Titer 5.1, OD 2.357), 고역가 (Titer 5.7, OD 2.558)에 따라 발색의 차이가 명백하여 판정이 용이하다.

표 5. 검사선 항체의 농도별 반응결과

검사선 표준품	0.18 $\mu$ g	0.27 $\mu$ g	0.36 $\mu$ g	0.45 $\mu$ g
음성검액	-	-	-	-
10 <sup>4.5</sup> TCID <sub>50</sub>	-	+/-	+	+
10 <sup>5.1</sup> TCID <sub>50</sub>	+/-	+	++	++
10 <sup>5.7</sup> TCID <sub>50</sub>	++	++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

이상의 결과로, 항-돼지열병 다클론 항체량이 0.36 $\mu$ g/strip 이상에서 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로, 0.36 $\mu$ g/strip을 정성분석 멤브레인에 고정화하는 항체의 최적량으로 결정하였다.

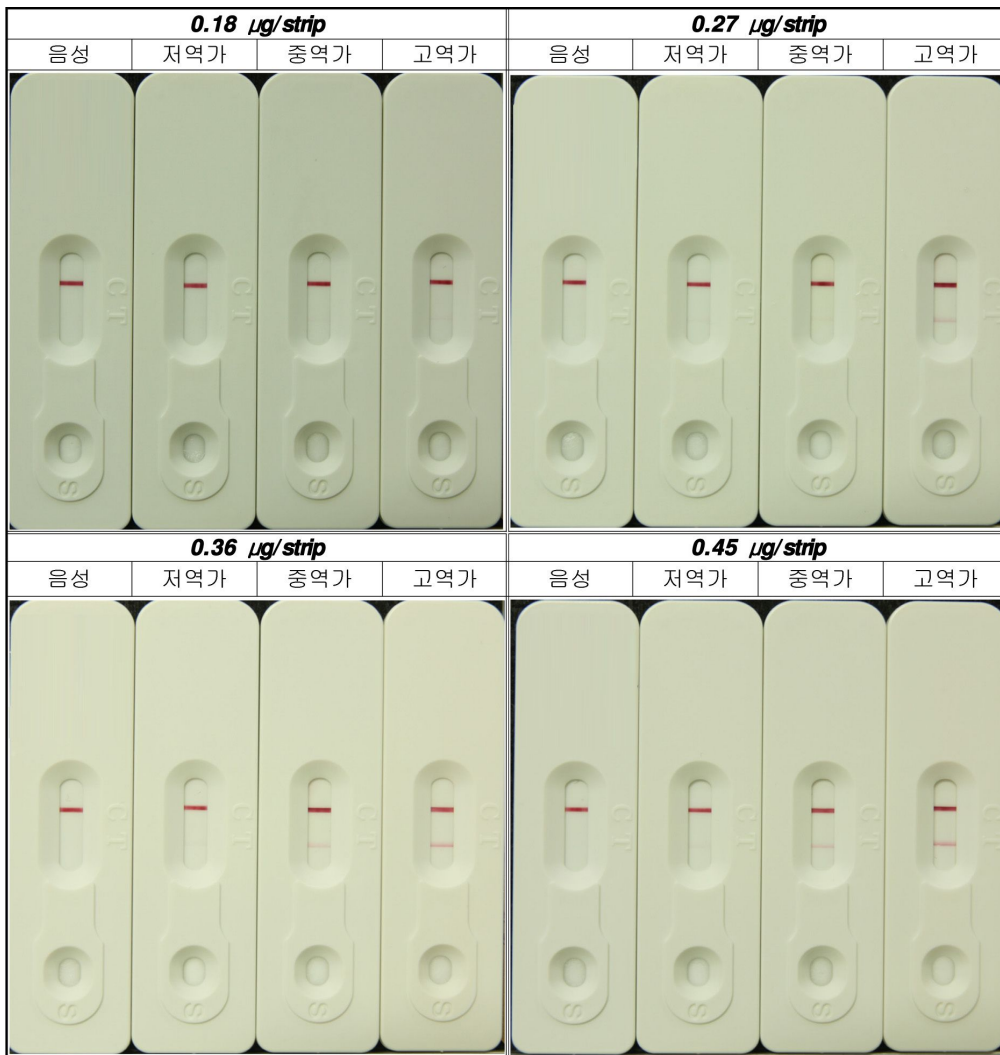


그림 14. 검사선 항체의 용량별 반응 결과

#### 나. 돼지열병바이러스 항체 진단용 스트립

##### A. 시험 방법

재조합 돼지열병바이러스 E2 항원 (Recombinant Classical Swine Fever virus E2)을 각각 0.11, 0.14, 0.18, 0.22 $\mu\text{g}/\text{strip}$ 의 양이 되도록 정성분석 멤브레인의 검사선 위치에 흡착시키고 각각을 조립하고, 검체 40 $\mu\text{l}$ 와 검체희석액 40 $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주한 후 15분에 판정한다.



B. 시험 결과 (표 6 및 그림 15)

- 음성 검액은 시간의 변화에 관계없이 검사선에서 발색을 나타내지 않는다.
- 양성 검액의 경우 0.11, 0.14 $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서는 전체적으로 발색이 약하며 특히 저역가에서 발색 강도가 현저히 떨어져 음·양성 판정이 어렵다.
- 0.18, 0.22 $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서는 저역가(1:32), 중역가(1:64), 고역가(1:128)에 따라 발색의 차이가 명백하여 판정이 용이하다.

표 6. 검사선 재조합항원의 농도별 반응결과

검사선 표준품	0.11 $\mu\text{g}$	0.14 $\mu\text{g}$	0.18 $\mu\text{g}$	0.22 $\mu\text{g}$
음성검액	-	-	-	-
1:32	-	+/-	+	+
1:64	+/-	+	++	++
1:128	++	++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

이상의 결과로, 재조합 돼지열병바이러스 E2 항원 (Recombinant Classical Swine Fever virus E2)량이 0.18 $\mu\text{g}/\text{strip}$  이상에서 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로, 0.18 $\mu\text{g}/\text{strip}$ 을 정성분석 멤브레인에 고정화하는 항원의 최적량으로 결정하였다.

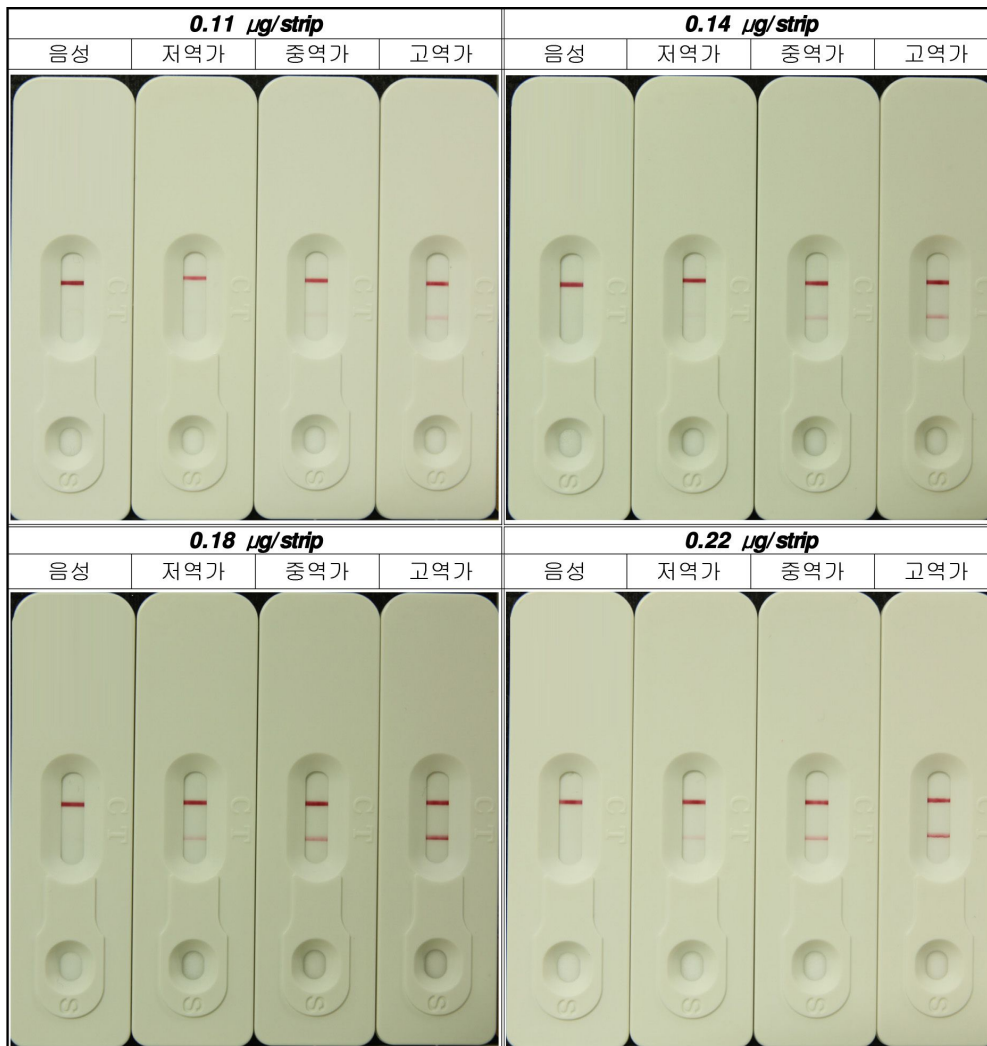


그림 15. 검사선 항원(E2)의 농도별 반응 결과

#### 다. 돼지열병바이러스 백신감별 (Erns) 진단용 스트립

##### A. 시험 방법

항-돼지열병바이러스 Erns 항원을 각각 0.1, 0.18, 0.27, 0.36 $\mu\text{g}/\text{strip}$ 의 양이 되도록 정성분석 멤브레인의 검사선 위치에 흡착시키고 각각을 조립하고, 검체 40 $\mu\text{l}$ 와 검액 40 $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주한 후 15분에 판정한다.

##### B. 시험 결과 (표 7 및 그림 16)

- 음성 검액은 시간의 변화에 관계없이 검사선에서 발색을 나타내지 않는다.

- 양성 검액의 경우 0.1, 0.18 $\mu$ g/strip에서는 전체적으로 발색이 약하며 특히 저역가에서 발색 강도가 현저히 떨어져 음·양성 판정이 어렵다.
- 0.27, 0.36 $\mu$ g/strip에서는 저역가(1/64 희석), 중역가(1/16 희석), 고역가(1/4 희석)에 따라 발색의 차이가 명백하여 판정이 용이하다.

표 7. 검사선 항원의 농도별 반응결과

검사선 표준품	0.1 $\mu$ g	0.18 $\mu$ g	0.27 $\mu$ g	0.36 $\mu$ g
음성검액	-	-	-	-
1/64	-	+/-	+	+
1/16	+/-	+	++	++
1/4	++	++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

이상의 결과로, 재조합 돼지열병바이러스 Erns 항원 (Recombinant Classical Swine Fever virus Erns)량이 0.27 $\mu$ g/strip 이상에서 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로, 0.27 $\mu$ g/strip을 정성분석 멤브레인에 고정화하는 항원의 최적량으로 결정하였다.

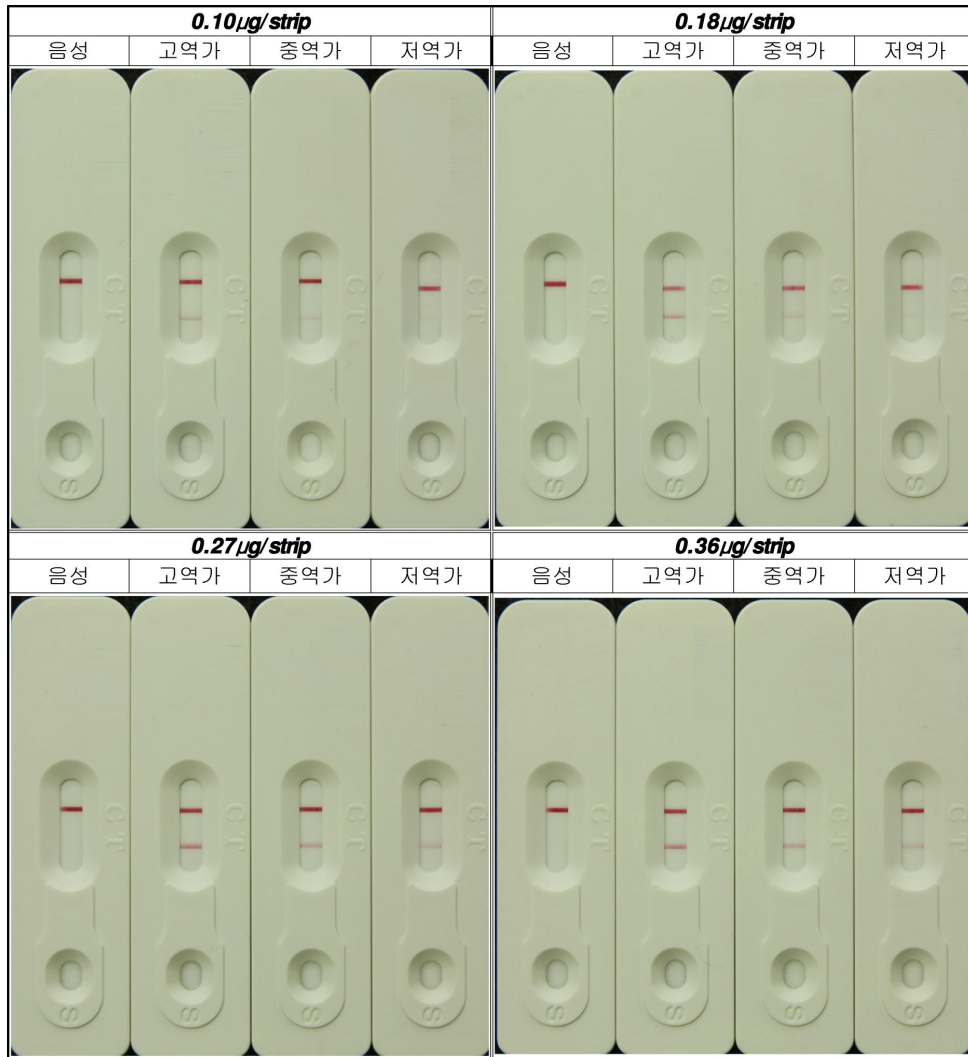


그림 16. 검사선 항원 (Erns)의 농도별 반응 결과

## 제 4 절 항체/항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양 설정

### 가. 돼지열병바이러스 항원 진단용

#### A. 시험 방법

항-돼지열병바이러스 단클론 항체와 금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양을 0.14, 0.20, 0.26, 0.32, 0.38  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 이 되도록 금 흡착 패드에 고정화시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하고, 검체 40 $\mu\text{l}$ 와 검액 40 $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검액 점

적부위(S)에 분주한 후, 10~15분에 판정한다.

B. 시험 결과 (표 8 및 그림 17)

- 0.14~0.20  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서 검사선과 대조선의 발색이 약하게 나타나며 특히 저역가에서는 오판을 할 가능성도 있다.
- 0.26~0.38  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서는 검사선과 대조선의 발색이 그 이하인 농도에 비해 상대적으로 진하고, 양에 상관없이 차이가 없음을 확인할 수 있다.

표 8. 골드 콘쥬게이트 항체의 농도별 반응결과

표준품 \ 골드양	0.14 $\mu\text{g}$	0.20 $\mu\text{g}$	0.26 $\mu\text{g}$	0.32 $\mu\text{g}$	0.38 $\mu\text{g}$
음성검액	-	-	-	-	-
$10^{4.5}$ TCID <sub>50</sub>	-	+/-	+	+	+
$10^{5.1}$ TCID <sub>50</sub>	+/-	+	++	++	++
$10^{5.7}$ TCID <sub>50</sub>	++	++	+++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

이상의 결과로, 항체-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양이 0.26  $\mu\text{g}/\text{strip}$  이상일 때 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로 0.26  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 을 최적량으로 결정하였다.

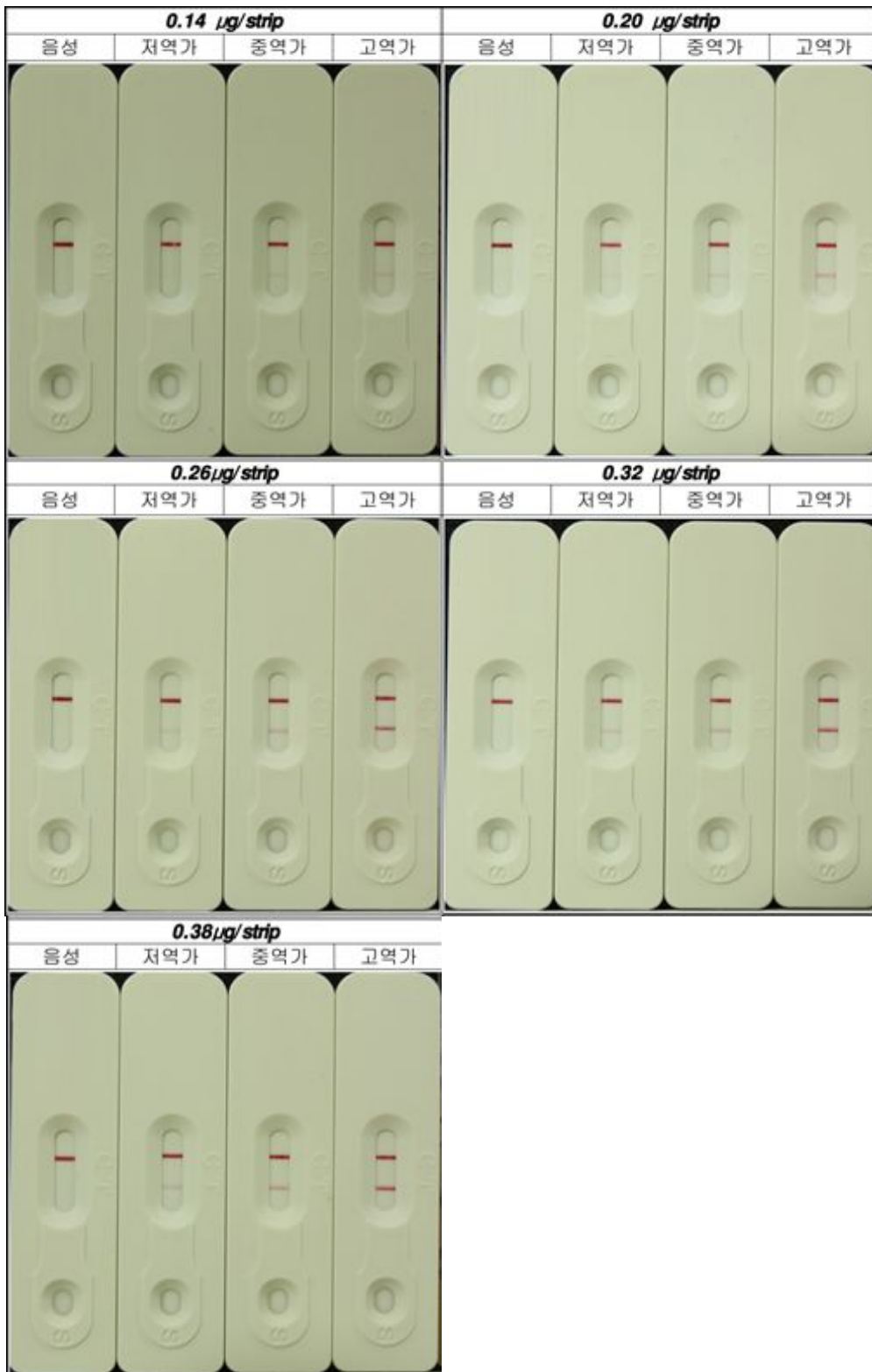


그림 17. 골드 콘쥬게이트 항체의 농도별 반응 결과

## 나. 돼지열병바이러스 항체 진단용

### A. 시험 방법

항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양을 0.03, 0.07, 0.13, 0.27, 0.54  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 이 되도록 금 흡착 패드에 고정화시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하고, 검체 40 $\mu\text{l}$ 와 검액 40 $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주한 후, 10~15분에 판정한다.

### B. 시험 결과 (표 9 및 그림 18)

- 0.03 ~ 0.07  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서 검사선과 대조선의 발색이 약하게 나타나며 특히 저역가에서는 오판을 할 가능성도 있다.
- 0.13~0.54  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서는 검사선과 대조선의 발색이 그 이하인 농도에 비해 상대적으로 진하고, 양에 상관없이 차이가 없음을 확인할 수 있다.

표 9. 골드 콘쥬게이트 재조합 E2항원의 농도별 반응결과

표준품 \ 골드양	0.03 $\mu\text{g}$	0.07 $\mu\text{g}$	0.13 $\mu\text{g}$	0.27 $\mu\text{g}$	0.54 $\mu\text{g}$
음성검액	-	-	-	-	-
1:32	-	+/-	+	+	+
1:64	+/-	+	++	++	++
1:128	++	++	+++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양이 0.13  $\mu\text{g}/\text{strip}$  이상일 때 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로 0.13  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 을 최적량으로 결정하였다.

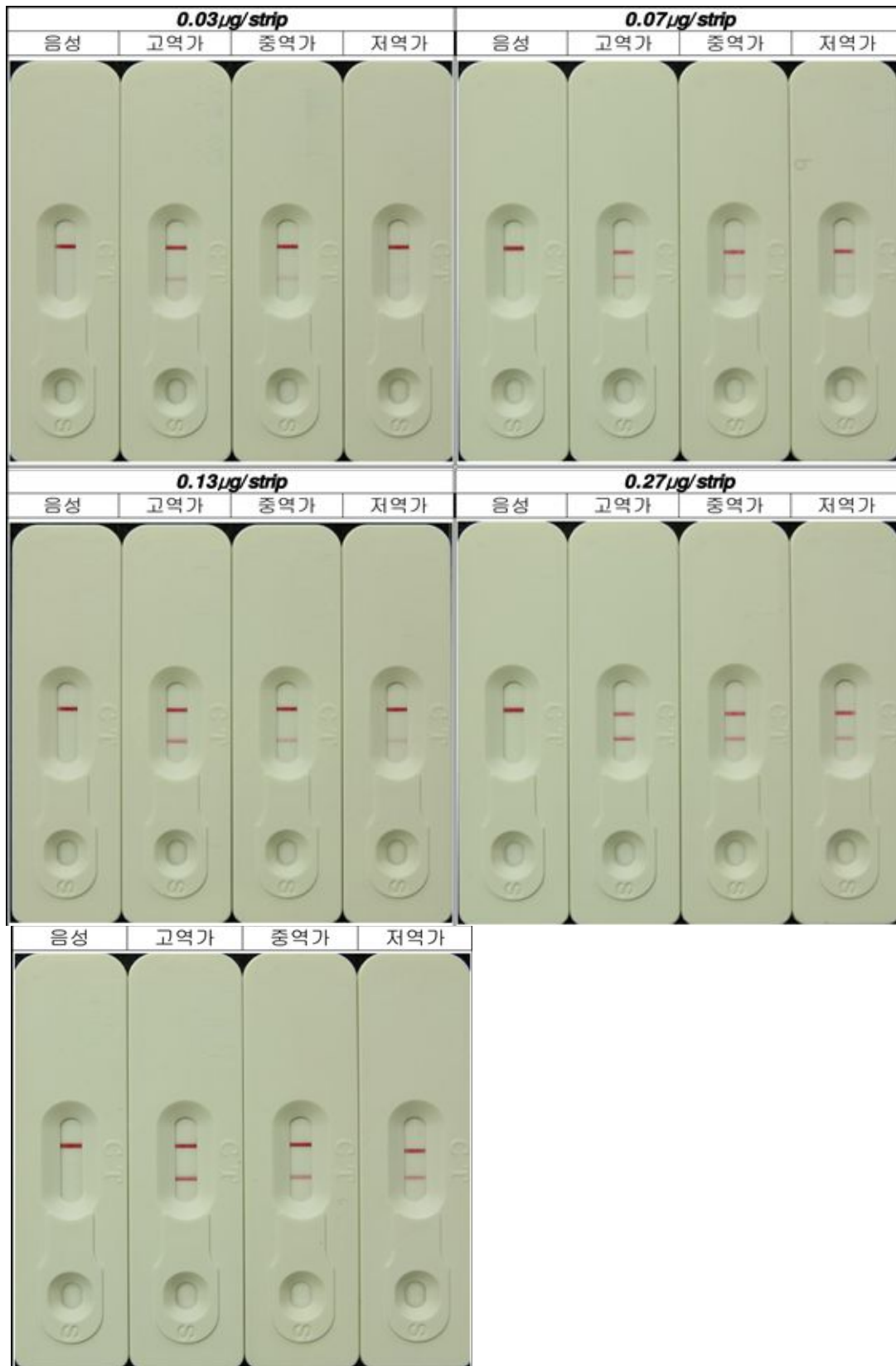


그림 18. 골드 콘쥬게이트 항원 농도별 반응 결과



## 다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단용

### A. 시험 방법

항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양을 0.14, 0.20, 0.26, 0.32, 0.38  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 이 되도록 금 흡착 패드에 고정화시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하고, 검체 40 $\mu\text{l}$ 와 검액 40 $\mu\text{l}$ 를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주한 후, 10~15분에 판정한다.

### B. 시험 결과 (표 10 및 그림 19)

- 0.14~0.20  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서 검사선과 대조선의 발색이 약하게 나타나며 특히 저역가에서는 오판을 할 가능성도 있다.
- 0.26~0.38  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 에서는 검사선과 대조선의 발색이 그 이하인 농도에 비해 상대적으로 진하고, 양에 상관없이 차이가 없음을 확인할 수 있다.

표 10. 골드 콘쥬게이트 제조합 Erns항원의 농도별 반응결과

골드양 표준품	0.14 $\mu\text{g}$	0.20 $\mu\text{g}$	0.26 $\mu\text{g}$	0.32 $\mu\text{g}$	0.38 $\mu\text{g}$
음성검액	-	-	-	-	-
1/64	-	+/-	+	+	+
1/16	+/-	+	++	++	++
1/4	++	++	+++	+++	+++

- : 음성 판정, +/- : 음성 또는 양성, +, ++, +++ : 양성

항원-금 접합체(골드 콘쥬게이트)의 양이 0.26  $\mu\text{g}/\text{strip}$  이상일 때 음성 및 양성 검액에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로 0.26  $\mu\text{g}/\text{strip}$ 을 최적량으로 결정하였다.

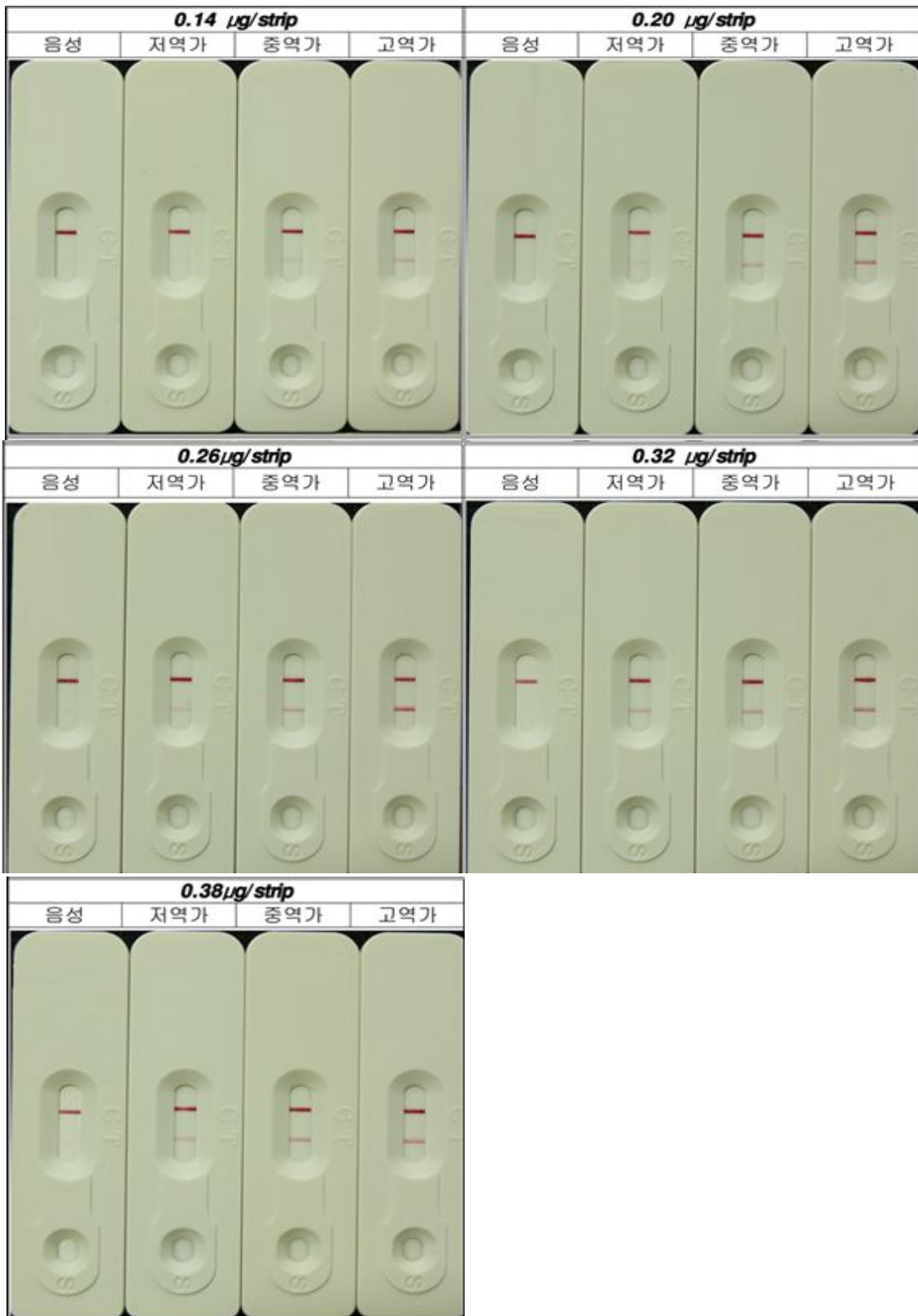


그림 19. 골드 콘쥬게이트 항원(Erns) 농도별 반응 결과

## 제 5 절 양성 표준검체 역가 기준 근거

### 가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트

ELISA를 통해 확인된 돼지열병바이러스 항원 진단을 위한 표준 시료를 SensPERT 키트와 반응 시켰을 때 검사선 (T)의 변화를 보면 ELISA OD 1.108 ~ 1.613를 갖는 검체에서는 약양성 반응을, OD 2.357 ~ 2.445 까지는 중양성 반응을, OD 2.558 이상에서는 강양성을 나타내었다 (그림 20 및 표 11). 따라서, 진단한계는 시험결과  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 으로 확인하였다. 대조선 (C)에서는 모두 강양성을 나타내게 된다.

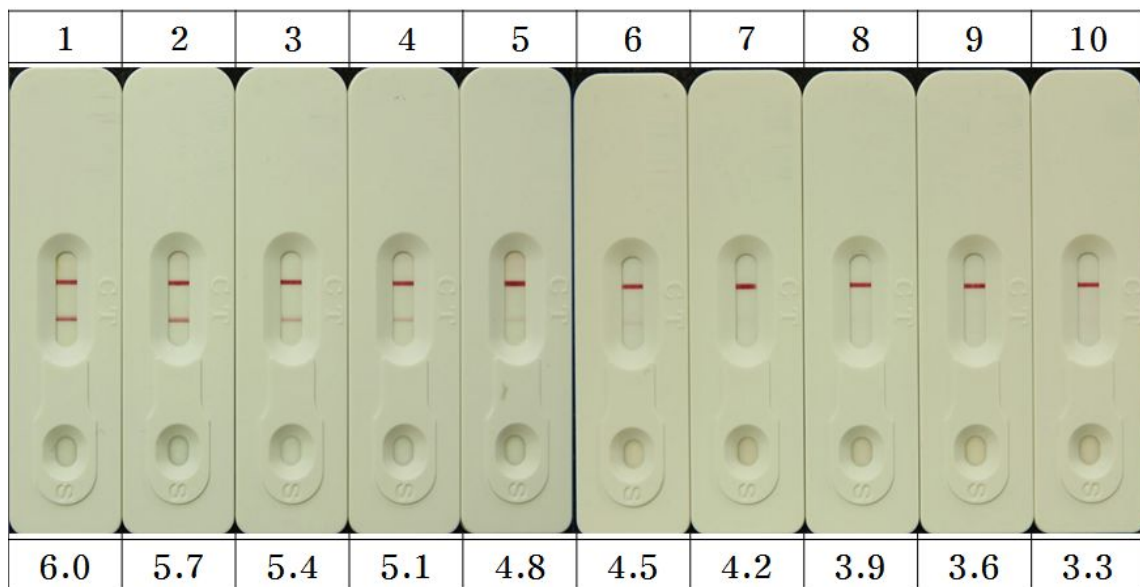


그림 20. SensPERT 돼지열병바이러스 항원 진단키트 역가별 시험 결과

표 11. 돼지열병바이러스 표준항원 역가별 시험 결과

No	Titer (log10)	OD	SD	CV%	ELISA 결과	SensPERT 결과
1	6.0	2.760	0.15	5.3	양성	+++
2	5.7	2.558	0.09	3.6	양성	+++
3	5.4	2.445	0.44	17.0	양성	++
4	5.1	2.357	0.30	12.9	양성	++
5	4.8	1.613	0.26	16.4	양성	+
6	4.5	1.108	0.01	1.4	양성	+
7	4.2	0.593	0.08	13.4	위양성	-
8	3.9	0.338	0.07	20.9	음성	-
9	3.6	0.192	0.00	1.1	음성	-
10	3.3	0.147	0.01	4.8	음성	-
PC		2.780	0.10	3.6	양성	+++
NC		0.169	0.01	3.4	음성	-

OD: Optical density, SD: Standard deviation, CV%: Coefficient of variation, - : 음성, +, ++, +++ : 양성

#### 나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트

ELISA를 통해 확인된 돼지열병바이러스 항체 진단을 위한 표준 시료를 SensPERT 키트와 반응 시켰을 때 검사선의 변화를 보면 1:32 역가에서는 약양성 반응을, 1:64 역가에서는 중양성 반응을, 1:128 이상에서는 강양성을 나타내었다 (그림 21 및 표 12). 따라서, 진단범위는 항체역가 1:32까지로 확인되었다. 대조선에서는 1:32~1:128 역가까지 모두 강양성을 나타내게 된다.

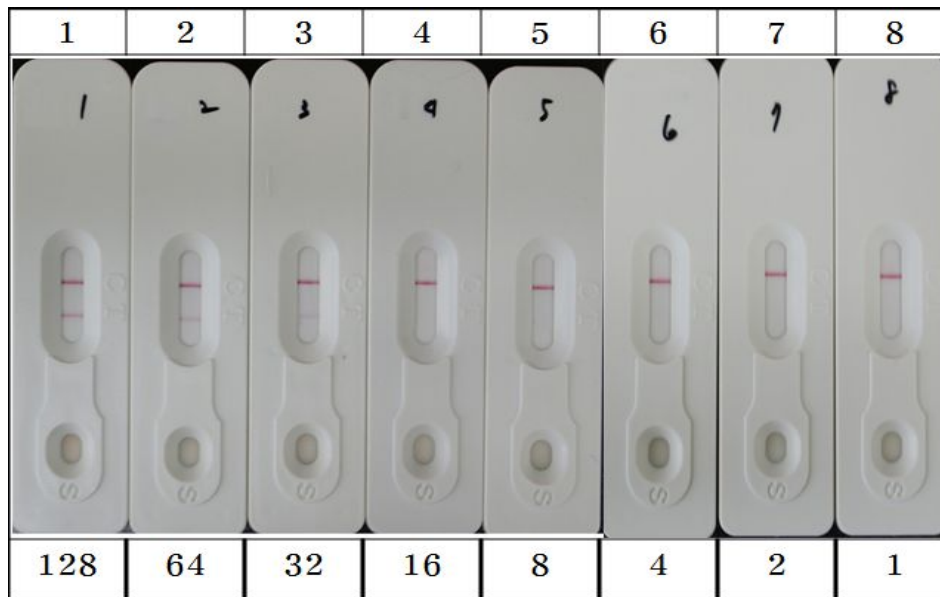


그림 21. SensPERT 돼지열병바이러스 항체 진단키트 역가별 시험 결과

표 12. 돼지열병바이러스 표준항체 역가별 시험 결과

No	Titer (VN titer)	OD	SD	CV%	ELISA 결과	SensPERT 결과
1	128	1.035	0.08	7.5	양성	+++
2	64	0.771	0.13	16.9	양성	++
3	32	0.490	0.07	14.3	양성	+
4	16	0.341	0.02	6.9	음성	-
5	8	0.218	0.02	8.8	음성	-
6	4	0.166	0.01	4.7	음성	-
7	2	0.134	0.01	8.4	음성	-
8	1	0.121	0.01	6.5	음성	-
PC		1.472	0.04	2.4	양성	+++
NC		0.167	0.01	3.4	음성	-

OD: Optical density, SD: Standard deviation, CV%: Coefficient of variation, - : 음성, +, ++, +++ : 양성

#### 다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트

Erns 항체를 진단하는 백신감별 키트의 경우, ELISA를 통해 확인된 돼지열병 바이러스 백신감별을 위한 양성시료를 SensPERT 키트와 반응 시켰을 때 검사선의 변화를 보면  $2^5$  희석에서는 약양성 반응을,  $2^4 \sim 2^3$  희석에서는 중양성 반응을,  $2^2$  희석이하에서는 강양성을 나타내었다 (그림 22 및 표 13). 대조선은 모든 역가에서 강양성을 나타내었다.

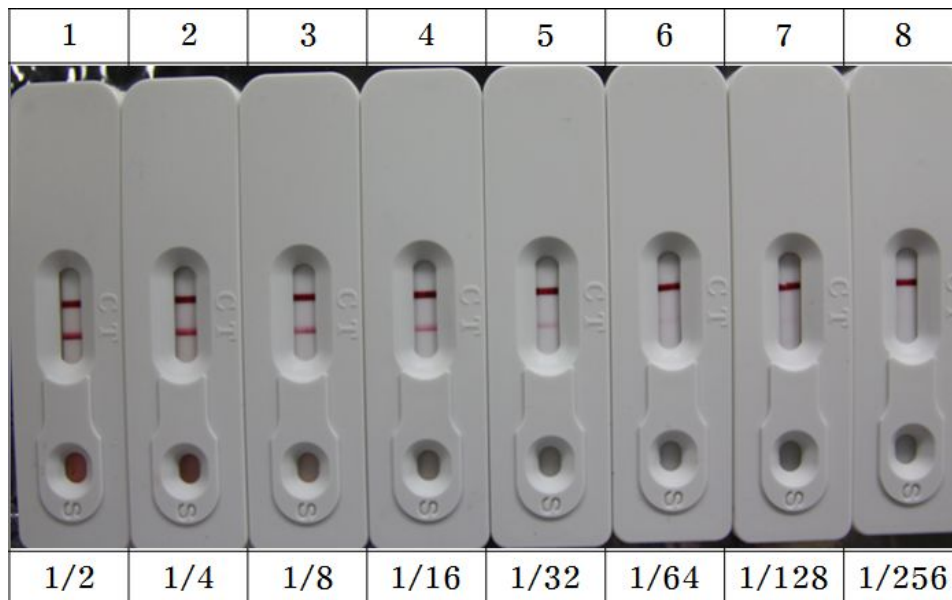


그림 22. SensPERT 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트 항체역가별 시험 결과

표 13. 돼지열병바이러스 Erns 항체 역가별 시험 결과

No	Titer (Dilution <sup>-1</sup> )	OD	SD	CV%	ELISA 결과	SensPERT 결과
1	2	2.64	0.21	7.95	양성	+++
2	4	2.58	0.16	6.38	양성	+++
3	8	2.45	0.17	6.81	양성	++
4	16	2.32	0.22	9.69	양성	++
5	32	2.15	0.17	7.86	양성	+
6	64	1.70	0.18	10.55	양성	+/-
7	128	1.23	0.09	7.50	양성	-
8	256	0.61	0.32	52.37	음성	-
PC		2.73	0.21	7.52	양성	+++
NC		0.36	0.07	18.53	음성	-

OD: Optical density, SD: Standard deviation, CV%: Coefficient of variation, - : 음성, +, ++, +++ : 양성

이상의 결과를 바탕으로, E2 마커 백신 접종검체에 대한 돼지열병바이러스 백신감별 키트의 감별력을 확인하기 위하여, E2 마커 백신 접종검체와 백신균주 접종검체를 백신 감별 키트와 항체진단 키트에 대해서 각각 반응 시켰고 추가로 각각에 대한 Erns양성 검체를 스파이킹하여 확인하였다.

그 결과, E2 마커 백신 접종검체와 백신균주 접종검체 모두 항체(E2)진단키트에 양성을 나타남을 확인하였고 백신감별 키트에서는 둘 다 음성으로 나타났다. Erns 양성 검체에 대해서는 항체(E2)진단키트에서 음성, 백신감별키트에서는 양성을 보여주었다(그림 23). 따라서, Erns가 없는 E2 마커 백신 접종검체에서는 아무런 반응을 보이지 않아(음성) 백신의 감별이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 백신 균주에 노출된 검체에서도 같게 나왔다. 백신 균주의 경우 E2 뿐만 아니라 Erns 중화 항체가 생성되는 것으로 알려졌기 때문에, 백신감별 키트에서도 반응성이 나타날 것으로 예상했으나, 그렇지 못한 결과가 나온 것은 생성된 Erns 항

체가 E2 중화 항체에 비해 역가가 상당히 낮을 것으로 추정되어, 이를 확인하고자 실제로 in house 방법에 따른 ELISA를 실시한 결과 E2 마커 백신 접종검체와 백신 균주에서 모두 Erns 에 대하여 음성으로 나타났다. 따라서 백신 균주에 의해 생성되는 Erns 항체에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Erns에 대한 마우스의 항혈청을 spiking한 검체군에서는 백신감별키트에서 양성을 보였으며, E2 항체진단키트에 대해서는 음성의 결과를 보임으로써 향후 E2마커 백신정체를 수행 시 필드에서 1차적으로 항체진단키트를 사용하여 스크리닝을 하고 그 결과 항체양성인 개체를 대상으로 마커백신접종 여부를 감별하기 위한 목적으로 감별진단키트를 적용 사용가능함을 제시하였다.

<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg);">                     접종검체                      키트                 </div>	E2 마커 백신		백신균주		Erns Spiking	
백신감별 키트 (Erns)						
항체진단 키트 (E2)						

그림 23. E2 마커백신 접종검체에 대한 센스퍼트 돼지열병 바이러스 백신감별 진단키트 와 항체 진단키트의 시험결과



## 제 6 절 표준 방법론 (ELISA) 과의 비교 임상 결과

- 목 적 : 본사제조 제품 (SensPERT)과 표준 방법론의 임상시험 특이도와 민감도 비교
- 방 법 : 용법 및 용량에 따라 음성 및 양성을 판정하였다. 표준방법론은 ELISA 법을 사용하여 비교 하였다.

### 가. 돼지열병바이러스 항원 진단키트

총 30개의 검체 중 ELISA 결과 위양성을 갖는 2 개의 검체를 제외하고, 28개의 검체로 비교 시험을 진행 하였다.

#### A. 상대 민감도 (Relative sensitivity analysis)

SensPERT vs. ELISA

$$\begin{aligned} & * \text{실제 양성 검체 수(TP)} / (\text{실제 양성 검체 수(TP)} + \text{위음성 검체수(FN)}) \times 100 \\ & = 10 / (10+0) \times 100 = 100\% \end{aligned}$$

#### B. 상대 특이도 (Relative specificity analysis)

SensPERT vs. ELISA

$$\begin{aligned} & * \text{실제 음성 검체 수(TN)} / (\text{실제 음성 검체 수(TN)} + \text{위양성 검체 수(FP)}) \times 100 \\ & = 17 / (17+1) \times 100 = 94\% \end{aligned}$$

표 14. SensPERT 돼지열병 바이러스 항원 진단키트와 표준방법(ELISA)과의  
비교 특이도와 민감도

구 분	ELISA		
	양성	음성	합계
SensPERT			
양성	10(TP)	1(FP)	11
음성	0(FN)	17 (TN)	17
합계	10	18	28
상대 민감도		100%	
상대 특이도		94%	

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

#### 나. 돼지열병바이러스 항체 진단키트

CSFV 백신 균주에 노출된 20개의 양성 샘플 (광양군)과, 노출되지 않은 20개의 음성 샘플 (제주군)으로 구성된 총 40 개의 검체를 가지고 ELISA 결과와 비교 시험을 진행하였다.

##### A. 상대 민감도 (Relative sensitivity analysis)

SensePERT vs. ELISA

$$* \text{실제 양성 검체 수(TP)} / (\text{실제 양성 검체 수(TP)} + \text{위음성 검체수(FN)}) \times 100 \\ = 20 / (20+0) \times 100 = 100\%$$

##### B. 상대 특이도 (Relative specificity analysis)

SensPERT vs. ELISA

$$* \text{실제 음성 검체 수(TN)} / (\text{실제 음성 검체 수(TN)} + \text{위양성 검체 수(FP)}) \times 100 \\ = 17 / (17+1) \times 100 = 94\%$$

표 15. SensPERT 돼지열병바이러스 항체 진단키트와 표준방법(ELISA)과의 비교  
특이도와 민감도

구 분	ELISA		
	양성	음성	합계
SensPERT			
양성	20(TP)	0(FP)	20
음성	0(FN)	20(TN)	20
합계	20	20	40
상대 민감도		100%	
상대 특이도		100%	

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

#### 다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트

돼지열병바이러스 백신감별 키트의 성능 테스트를 위해 E2 항원에 대해 ELISA 값이 양성으로 확인된 10종의 E2 마커 백신 접종 검체군과 10종의 백신균주 접종 검체군(광양군), 그리고 30종의 Erns 항혈청 spiking 검체군들의 Erns 항원에 대한 ELISA와 SensPERT 키트에 대한 민감도와 특이도를 비교하였다.

##### A. 상대 민감도 (Relative sensitivity analysis)

SensePERT vs. ELISA

$$* \text{ 실제 양성 검체 수(TP)} / (\text{실제 양성 검체 수(TP)} + \text{위음성 검체수(FN)}) \times 100 \\ = 30 / (30 + 0) \times 100 = 100\%$$

##### B. 상대 특이도 (Relative specificity analysis)

SensPERT vs. ELISA

$$* \text{ 실제 음성 검체 수(TN)} / (\text{실제 음성 검체 수(TN)} + \text{위양성 검체 수(FP)}) \times 100 \\ = 20 / (20 + 0) \times 100 = 100\%$$

표 16. SensPERT 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트와 표준방법(ELISA)과의 비교 특이도와 민감도

구 분	ELISA		
	양성	음성	합계
SensPERT			
양성	30(TP)	0(FP)	30
음성	0(FN)	20(TN)	20
합계	30	20	50
상대 민감도		100%	
상대 특이도		100%	

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

## 제 7 절 임상시험 성적 요약

### 가. 돼지열병바이러스 항원 진단

표 17. 돼지열병바이러스 항원 진단 비교 시험 결과

No.	검체명	표준법 (ELISA)	베트올(주) (SensPERT)	시료
1	S01	양성	양성	LOM주 배양희석시료
2	S02	양성	양성	LOM주 배양희석시료
3	S03	양성	양성	LOM주 배양희석시료
4	S04	양성	양성	LOM주 배양희석시료
5	S05	양성	양성	LOM주 배양희석시료
6	S06	양성	양성	LOM주 배양희석시료
7	S07	위양성	음성	LOM주 배양희석시료
8	S08	음성	음성	LOM주 배양희석시료
9	S09	음성	음성	LOM주 배양희석시료

10	S10	음성	음성	LOM주 배양희석시료
11	S11	음성	음성	LOM주 배양희석시료
12	S12	음성	음성	LOM주 배양희석시료
13	S21	양성	양성	재조합항원 CSFV E2
14	S22	양성	양성	재조합항원 CSFV E2
15	S23	양성	양성	재조합항원 CSFV E2
16	S24	양성	양성	재조합항원 CSFV E2
17	S25	위양성	양성	재조합항원 CSFV E2
18	S26	음성	양성	재조합항원 CSFV E2
19	S27	음성	음성	재조합항원 CSFV E2
20	S28	음성	음성	돼지 백혈구 시료
21	S29	음성	음성	돼지 백혈구 시료
22	S30	음성	음성	돼지 백혈구 시료
23	S31	음성	음성	돼지 백혈구 시료
24	S32	음성	음성	돼지 백혈구 시료
25	S33	음성	음성	돼지 백혈구 시료
26	S34	음성	음성	돼지 백혈구 시료
27	S35	음성	음성	돼지 백혈구 시료
28	S36	음성	음성	돼지 백혈구 시료
29	S37	음성	음성	돼지 백혈구 시료
30	S48	음성	음성	정상 PK-15 세포주

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10
양성	양성	양성	양성	양성	양성	음성	음성	음성	음성

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S21	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28
음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S11	S12	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28
음성	음성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	음성	음성

그림 24. 임상시료를 이용한 돼지열병바이러스 항원진단키트의 검사결과

나. 돼지열병바이러스 항체 진단

표 18. 돼지열병바이러스 항체 진단 비교 시험 결과

No.	검체명	표준법 (ELISA)	베트올(주) (SensPERT)	시료
1	G1	양성	양성	광양혈장
2	G2	양성	양성	광양혈장
3	G3	양성	양성	광양혈장
4	G4	양성	양성	광양혈장
5	G5	양성	양성	광양혈장
6	G6	양성	양성	광양혈장
7	G7	양성	양성	광양혈장
8	G8	양성	양성	광양혈장
9	G9	양성	양성	광양혈장
10	G10	양성	양성	광양혈장
11	G11	양성	양성	광양혈장
12	G12	양성	양성	광양혈장
13	G13	양성	양성	광양혈장
14	G14	양성	양성	광양혈장
15	G15	양성	양성	광양혈장
16	G16	양성	양성	광양혈장
17	G17	양성	양성	광양혈장
18	G18	양성	양성	광양혈장
19	G19	양성	양성	광양혈장
20	G20	양성	양성	광양혈장
21	J1	음성	음성	제주혈장
22	J2	음성	음성	제주혈장
23	J3	음성	음성	제주혈장

24	J4	음성	음성	제주혈장
25	J5	음성	음성	제주혈장
26	J6	음성	음성	제주혈장
27	J7	음성	음성	제주혈장
28	J8	음성	음성	제주혈장
29	J9	음성	음성	제주혈장
30	J10	음성	음성	제주혈장
31	J11	음성	음성	제주혈장
32	J12	음성	음성	제주혈장
33	J13	음성	음성	제주혈장
34	J14	음성	음성	제주혈장
35	J15	음성	음성	제주혈장
36	J16	음성	음성	제주혈장
37	J17	음성	음성	제주혈장
38	J18	음성	음성	제주혈장
39	J19	음성	음성	제주혈장
40	J20	음성	음성	제주혈장





11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성











그림 25. 임상시료를 이용한 돼지열병바이러스 항체진단키트의 검사결과


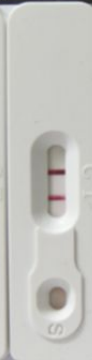
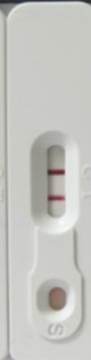
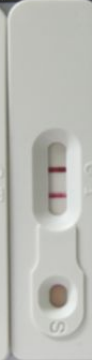
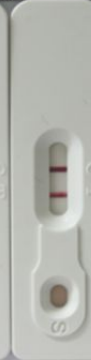
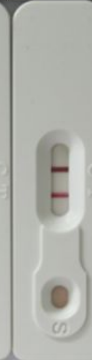


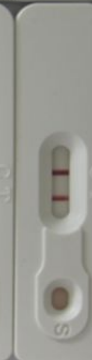

다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단











표 19. 돼지열병바이러스 백신 감별용 검체 시험 결과

No.	검체명	표준법 (ELISA)	베트올(주)	시료
1	G1	음성	음성	광양혈장
2	G2	음성	음성	광양혈장
3	G3	음성	음성	광양혈장
4	G4	음성	음성	광양혈장
5	G5	음성	음성	광양혈장
6	G6	음성	음성	광양혈장
7	G7	음성	음성	광양혈장
8	G8	음성	음성	광양혈장
9	G9	음성	음성	광양혈장
10	G10	음성	음성	광양혈장
11	E2M1	음성	음성	E2마커백신
12	E2M2	음성	음성	E2마커백신
13	E2M3	음성	음성	E2마커백신
14	E2M4	음성	음성	E2마커백신
15	E2M5	음성	음성	E2마커백신
16	E2M6	음성	음성	E2마커백신
17	E2M7	음성	음성	E2마커백신
18	E2M8	음성	음성	E2마커백신
19	E2M9	음성	음성	E2마커백신
20	E2M10	음성	음성	E2마커백신
21	SP1	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
22	SP2	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
23	SP3	양성	양성	Erns Spiking (고역가)

24	SP4	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
25	SP5	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
26	SP6	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
27	SP7	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
28	SP8	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
29	SP9	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
30	SP10	양성	양성	Erns Spiking (고역가)
31	SP11	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
32	SP12	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
33	SP13	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
34	SP14	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
35	SP15	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
36	SP16	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
37	SP17	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
38	SP18	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
39	SP19	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
40	SP20	양성	양성	Erns Spiking (중역가)
41	SP21	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
42	SP22	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
43	SP23	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
44	SP24	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
45	SP25	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
46	SP26	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
47	SP27	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
48	SP28	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
49	SP29	양성	양성	Erns Spiking (저역가)
50	SP30	양성	양성	Erns Spiking (저역가)

백신균주 접종 검체									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									
음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

Erns 항혈청 spiking 검체 (고역가)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									
양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성

E2 marker vaccine 접종 검체									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									
음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

Erns 항혈청 spiking 검체 (중역가)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성

Erns 항혈청 spiking 검체 (저역가)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성	양성

그림 26 임상시료를 이용한 돼지열병바이러스 백신감별 진단키트의 검사결과

## 제 8 절 표준법 ELISA 시험 결과

ELISA 값에 대한 결과 판정은 가검 시료의 % S/P 값을 계산하여 판정하였다. 판정 기준은 (%) S/P 값이 15 미만일 경우 음성, 15 이상 20 미만일 경우 위양성, 그리고 20 이상일 경우 양성으로 하였다 {(%) S/P = (가검시료 평균흡광도 - 음성대조 평균흡광도)/CPC X 100, CPC = 양성대조 평균흡광도 - 음성대조

평균흡광도).

가. 돼지열병바이러스 항원 시험

표 20. 돼지열병바이러스 검체에서 항원-ELISA 시험 결과

No.	검체명	Test1	Test2	통계			
		OD	OD	Mean	SD	% S/P	결과
1	S01	2.656	2.863	2.760	0.15	99	양성
2	S02	2.382	2.507	2.445	0.09	87	양성
3	S03	2.250	2.866	2.558	0.44	91	양성
4	S04	2.142	2.571	2.357	0.30	83	양성
5	S05	1.426	1.799	1.613	0.26	55	양성
6	S06	1.028	1.008	1.018	0.01	32	양성
7	S07	0.537	0.649	0.593	0.08	16	위양성
8	S08	0.288	0.388	0.338	0.07	6	음성
9	S09	0.190	0.193	0.192	0.00	0.8	음성
10	S10	0.142	0.152	0.147	0.01	-	음성
11	S11	0.158	0.161	0.160	0.00	-	음성
12	S12	0.123	0.120	0.122	0.00	-	음성
13	S21	2.508	2.688	2.598	0.13	93	양성
14	S22	2.333	2.843	2.588	0.36	92	양성
15	S23	1.821	2.015	1.918	0.14	66	양성
16	S24	1.150	1.347	1.249	0.14	41	양성
17	S25	0.601	0.616	0.609	0.01	16	위양성
18	S26	0.310	0.443	0.377	0.09	7	음성
19	S27	0.179	0.255	0.217	0.05	1	음성
20	S28	0.084	0.249	0.167	0.12	-	음성
21	S29	0.110	0.257	0.184	0.10	0	음성
22	S30	0.074	0.247	0.161	0.12	-	음성

23	S31	0.151	0.184	0.168	0.02	-	음성
24	S32	0.087	0.192	0.140	0.07	-	음성
25	S33	0.111	0.104	0.108	0.00	-	음성
26	S34	0.107	0.179	0.143	0.05	-	음성
27	S35	0.079	0.138	0.109	0.04	-	음성
28	S36	0.098	0.125	0.112	0.02	-	음성
29	S37	0.100	0.116	0.108	0.01	-	음성
30	S48	0.073	0.159	0.116	0.06	-	음성
	PC	2.681	2.881	2.780	0.10	100	양성
	NC	0.158	0.180	0.169	0.01	0	음성

나. 돼지열병바이러스 항체 시험

표 21. 돼지열병바이러스 검체에서 항체-ELISA 시험결과

No.	검체명	Test1	Test2	통계			
		OD	OD	Mean	SD	%S/P	결과
1	G1	1.119	0.571	0.845	0.39	51	양성
2	G2	1.157	0.962	1.060	0.14	68	양성
3	G3	1.657	1.592	1.625	0.05	111	양성
4	G4	1.425	1.244	1.335	0.13	89	양성
5	G5	1.371	1.254	1.313	0.08	87	양성
6	G6	1.408	1.199	1.304	0.15	87	양성
7	G7	1.366	1.192	1.279	0.12	85	양성
8	G8	1.351	1.194	1.273	0.11	84	양성
9	G9	1.299	1.198	1.249	0.07	82	양성
10	G10	1.556	1.359	1.458	0.14	98	양성
11	G11	1.563	1.345	1.454	0.15	98	양성
12	G12	0.832	0.881	0.857	0.03	52	양성

13	G13	1.106	0.941	1.024	0.12	65	양성
14	G14	1.565	1.288	1.427	0.20	96	양성
15	G15	1.489	1.347	1.418	0.10	95	양성
16	G16	1.172	1.181	1.176	0.00	77	양성
17	G17	1.273	1.080	1.177	0.14	77	양성
18	G18	1.463	1.263	1.363	0.14	91	양성
19	G19	0.226	0.223	1.145	0.12	74	양성
20	G20	1.502	1.451	1.477	0.04	100	양성
21	J1	0.153	0.196	0.175	0.03	0.6	음성
22	J2	0.185	0.110	0.148	0.05	-	음성
23	J3	0.170	0.226	0.198	0.04	2.3	음성
24	J4	0.109	0.104	0.107	0.00	-	음성
25	J5	0.145	0.152	0.149	0.00	-	음성
26	J6	0.112	0.172	0.142	0.04	-	음성
27	J7	0.135	0.196	0.166	0.04	-	음성
28	J8	0.111	0.162	0.137	0.04	-	음성
29	J9	0.132	0.127	0.130	0.00	-	음성
30	J10	0.119	0.126	0.123	0.00	-	음성
31	J11	0.120	0.112	0.116	0.01	-	음성
32	J12	0.101	0.099	0.100	0.00	-	음성
33	J13	0.114	0.123	0.119	0.01	-	음성
34	J14	0.109	0.110	0.110	0.00	-	음성
35	J15	0.129	0.128	0.129	0.00	-	음성
36	J16	0.107	0.097	0.102	0.01	-	음성
37	J17	0.111	0.106	0.109	0.00	-	음성
38	J18	0.118	0.116	0.117	0.00	-	음성
39	J19	0.123	0.120	0.122	0.00	-	음성
40	J20	0.136	0.114	0.125	0.02	-	음성
	PC	1.463	1.481	1.472	0.01	100	양성



	NC	0.153	0.182	0.167	0.02	0	음성
--	----	-------	-------	-------	------	---	----

다. 돼지열병바이러스 백신감별 시험

표 22. 돼지열병바이러스 검체에서 Erns 항체-ELISA 시험결과

No.	검체명	Test1	Test2	통계			결과
		OD		Mean	SD	%S/P	
1	G1	0.349	0.339	0.344	0.007	-	음성
2	G2	0.175	0.149	0.162	0.018	-	음성
3	G3	0.192	0.148	0.170	0.031	-	음성
4	G4	0.254	0.196	0.225	0.041	-	음성
5	G5	0.226	0.164	0.195	0.044	-	음성
6	G6	0.138	0.078	0.108	0.042	-	음성
7	G7	0.153	0.107	0.130	0.033	-	음성
8	G8	0.281	0.201	0.241	0.057	-	음성
9	G9	0.235	0.217	0.226	0.013	-	음성
10	G10	0.189	0.119	0.154	0.049	-	음성
11	E2M1	0.170	0.086	0.128	0.059	-	음성
12	E2M2	0.234	0.126	0.180	0.076	-	음성
13	E2M3	0.189	0.027	0.108	0.115	-	음성
14	E2M4	0.194	0.130	0.162	0.045	-	음성
15	E2M5	0.143	0.095	0.119	0.034	-	음성
16	E2M6	0.264	0.174	0.219	0.064	-	음성
17	E2M7	0.158	0.094	0.126	0.045	-	음성
18	E2M8	0.263	0.241	0.252	0.016	-	음성
19	E2M9	0.120	0.220	0.170	0.071	-	음성
20	E2M10	0.253	0.139	0.196	0.081	-	음성
21	SP1	2.248	2.658	2.453	0.290	88	양성

22	SP2	2.283	2.721	2.502	0.310	90	양성
23	SP3	2.323	2.673	2.498	0.247	90	양성
24	SP4	2.334	2.648	2.491	0.222	90	양성
25	SP5	2.401	2.545	2.473	0.102	89	양성
26	SP6	2.420	2.556	2.488	0.096	90	양성
27	SP7	2.312	2.618	2.465	0.216	89	양성
28	SP8	2.330	2.646	2.488	0.224	90	양성
29	SP9	2.250	2.726	2.488	0.337	90	양성
30	SP10	2.337	2.599	2.468	0.185	89	양성
31	SP11	1.921	2.325	2.123	0.286	74	양성
32	SP12	1.988	2.080	2.034	0.065	71	양성
33	SP13	1.954	2.030	1.992	0.054	69	양성
34	SP14	1.799	1.969	1.884	0.120	64	양성
35	SP15	1.785	1.883	1.834	0.069	62	양성
36	SP16	1.883	1.963	1.923	0.057	66	양성
37	SP17	2.014	1.792	1.903	0.157	65	양성
38	SP18	1.942	1.630	1.786	0.221	60	양성
39	SP19	1.774	1.934	1.854	0.113	63	양성
40	SP20	2.004	1.940	1.972	0.045	68	양성
41	SP21	1.145	1.279	1.212	0.095	36	양성
42	SP22	0.986	1.410	1.198	0.300	35	양성
43	SP23	1.146	1.420	1.283	0.194	39	양성
44	SP24	1.284	1.394	1.339	0.078	41	양성
45	SP25	1.100	1.288	1.194	0.133	35	양성
46	SP26	1.324	1.262	1.293	0.044	39	양성
47	SP27	1.201	1.165	1.183	0.025	35	양성
48	SP28	1.572	1.112	1.342	0.325	41	양성
49	SP29	1.356	1.114	1.235	0.171	37	양성
50	SP30	1.307	1.249	1.278	0.041	39	양성

	PC	2.880	2.589	2.735	0.206	100	양성
	NC	0.410	0.315	0.363	0.067	0	음성

## 제 9 절 개발제품의 재현성검사

개발된 제품에 대한 양산 조건 수립을 위하여 제품의 재현성을 확인을 위하여 각 제품 (항원진단, 항체진단 그리고 백신감별 진단)의 3Lot 제품의 검사 및 시험자간의 재현성 검사를 표준시료(음성 1개와 양성 3개)를 사용하여 재현성 검사를 하였다. 그 결과를 보면 3Lot 제품에 대한 검사결과가 동등하게 나타나 Lotr간의 재현성을 확인하였다(표23, 표 25, 표27). 또한 시험자간의 검사결과에 대한 재현성을 확인하였다(표24, 표 26, 표28).

가. 돼지열병바이러스 항원 진단 키트

### 1) 3 Lot 검사

표23. 3 Lot 검사에 따른 재현성 실험(n=3)

구분	Lot		
	1	2	3
표준시료	1	2	3
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: 정상 PK-15 세포주, 양성: LOM주 배양희석시료 (S01, S02, S03).

2) 시험자간 (Inter-person) 검사

**표24. Inter-person 검사에 따른 재현성 실험(n=3)**

구분	시험자		
	A	B	C
표준시료	A	B	C
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: 정상 PK-15 세포주, 양성: LOM주 배양희석시료 (S01, S02, S03)

나. 돼지열병바이러스 항체 진단 키트

1) 3 Lot 검사

**표25. 3 Lot 검사에 따른 재현성 실험(n=3)**

구분	Lot		
	1	2	3
표준시료	1	2	3
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: 제주혈장, 양성: 광양혈장 (G18, G19, G20)

2) 시험자간 (Inter-person) 검사

표26. Inter-person 검사에 따른 재현성 실험(n=3)

구분	시험자		
	A	B	C
표준시료			
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: 제주혈장, 양성: 광양혈장 (G18, G19, G20)

다. 돼지열병바이러스 백신감별 진단 키트

1) 3 Lot 검사

표27. 3 Lot 검사에 따른 재현성 실험(n=3)

구분	Lot		
	1	2	3
표준시료			
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: E2 마커백신 (E2M1), 양성: Erns spiking (SP1, SP11, SP21)

2) 시험자간 (Inter-person) 검사

표28. Inter-person 검사에 따른 재현성 실험(n=3)

구분	시험자		
	A	B	C
표준시료	A	B	C
음성	-	-	-
양성1	+	+	+
양성2	+	+	+
양성3	+	+	+

음성: E2 마커백신 (E2M1), 양성: Erns spiking (SP1, SP11, SP21)

## 제 10 절 개발제품의 교차반응검사

개발된 돼지열병바이러스 진단제품이 타 유사한 병원체나 또는 그에 대한 항체를 가지고 있는 시료들 간의 교차반응이 있는지 여부를 검사하였다.

가. 돼지열병바이러스 항원 진단 키트

표29. 유사 바이러스(항원)과의 교차반응 시험결과(n=3)

바이러스(항원)	결과
음성시료	-
CSFV	+
BVDV	-
PRRSV	-

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus. PRRSV: Porcine Reproductive and respiratory syndrome Virus

나. 돼지열병바이러스 항체 진단 키트

표30. 유사 바이러스(항원)과의 교차반응 시험결과(n=3)

항원	결과
음성시료	-
CSFV	+
BVDV	-
PRRSV	-

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus. PRRSV: Porcine Reproductive and respiratory syndrome Virus

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	평가의 착안점
				착안사항
1차 연도 (2009)	돼지열병 진단시스템 제품개발 및 산업화	1. 돼지열병바이러스 항원 신속진단키트 Prototype 개발 및 유효성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 돼지열병바이러스 유효 항체의 선정 및 유효성 검증</li> <li>○ 키트 조건 선정(코팅 항체 및 conjugate)</li> <li>○ 표준검체 역가기준 설정</li> <li>○ 항원 신속진단키트 Prototype개발</li> <li>○ 표준방법과의 비교실험을 통한 유효성 검증</li> </ul>
		2. 돼지열병바이러스 항체 신속진단키트 Prototype 개발 및 유효성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 돼지열병바이러스 E2 유효 항원의 선정 및 유효성 검증</li> <li>○ 키트 조건 선정(코팅 항원 및 conjugate 항원)</li> <li>○ 표준검체 역가기준 설정</li> <li>○ 항체 신속진단키트 Prototype개발</li> <li>○ 표준방법과의 비교실험을 통한 유효성 검증</li> </ul>
		3. 돼지열병바이러스 백신감별 신속진단키트 Prototype 개발 및 유효성 평가	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 돼지열병바이러스 Erns유효 항원의 선정 및 유효성 검증</li> <li>○ 키트 조건 선정(코팅 항원 및 conjugate 항원)</li> <li>○ 표준검체 역가기준 설정</li> <li>○ 항체 신속진단키트</li> </ul>



				Prototype개발 ○ 표준방법과의 비교실험을 통한 유효성 검증
2차 연도 (2010)	돼지열병 진단시스템 제품개발 및 산업화	1. 돼지열병바이러스 항원 신속진단키트 상용화 개발, 유효성 평가 및 임상시험	100%	○ 돼지열병바이러스 유효 항체 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스항원 신속진단키트의 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스항원 신속진단키트의 비교 임상시험(민감도 100%, 특이도 94%)
		2. 돼지열병바이러스 항체 신속진단키트 상용화 개발 유효성 평가 및 임상시험	100%	○ 돼지열병바이러스 E2 유효 항원 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스항체 신속진단키트의 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스항체 신속진단키트의 비교 임상시험(민감도 100%, 특이도 100%)
		3. 돼지열병바이러스 백신 감별 신속진단키트 상용화 개발 유효성 평가 및 임상시험	100%	○ 돼지열병바이러스 Erns유효 항원 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스 항체감별 신속진단키트의 대량생산 시스템 구축 ○ 돼지열병바이러스 백신감별 신속진단키트의 비교 임상시험(민감도 100%, 특이도 100%)

## 제2절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

본 과제를 통하여 현재 돼지열병바이러스 진단분야에서 전무한 현장에서 신속계 진단할 수 있는 돼지열병 바이러스 신속진단키트(항원진단, 항체진단 그리고 백신감별)를 세계최초로 개발하였다. 따라서 본 연구과제로 개발된 3종 제품군을 돼지열병 바이러스 방역사업에 활용하여 국내 마커백신의 안정적 도입 및 진단시스템의 구축에 기여할 것으로 본다. 구체적인 기여도는 아래와 같다.

### 가. 기술적 측면

- 현장조기 진단 가능한 제품개발 기술력 확보: 농장에서 1차 스크리닝으로서 본 과제의 개발 제품을 검사를 선택할 경우 현장에서의 진단 결과 확보에 기반한 진료방향 결정 및 잠복감염의 조기진단에 많은 도움이 될 것임.
- 유전자 재조합 마커백신 사용 시 백신항체와 야외감염 항체를 감별할 수 있는 검사법 확립
- 현장에서 신속정확하게 조기검진 및 제어시스템 확보:질병 발생 위험지역 및 도축장 등 현장에서의 진단 결과를 확보함으로써 돼지열병확산 방지 및 안전한돈육 유통 가능
- 유효 항원, 항체 선별 및 생산 기술력 확보를 통한 타 제품개발의 핵심요소 확보
- 신종 감염성 질병의 유행 가능성 및 분포 지역의 확대 등의 위험성이 매년 증가함에 따라 각 국가별 관리 체계 확립과 질병의 조기 진단을 위한 모니터링 도구로써 활용 가능.
- 인의(인체 의학) 및 수의(수의학) 분야의 진단제, 치료제 및 백신개발을 위한 중요한 도구로 활용 가능.
- 보다 많은 법정전염병으로 적용 가능한 기술 기반으로 사용 될 것이며, 이를 기반으로 보다 많은 타겟을 분석할 수 있는 차세대 단백질 바이오칩 개발에 활용 가능함.

## 나. 경제·산업적 측면

- 조기진단/제어시스템을 통한 돼지열병 청정구역 실현 및 양돈 수출증대 및 고부가가치 창출
- 기존 진단법과 비교 시 시간, 비용 절감 효과
- 주도권 확보: 백신 감별 가능한 제품으로 제품경쟁력 우위확보를 통한 시장 우위선점
- 신시장 창출: 국내 최초(세계최초)의 Lateral-flow immunoassay 원리를 기반으로 한 돼지열병 진단으로 10분 내 진단할 수 있는 제품이므로 신시장을 창출할 것으로 기대함.
- 수입대체효과: 국산화를 통한 해외제품 대체효과
- 수출증대효과: 해외양돈 사업자의 현장에서 필요성을 만족하는 제품으로서 수출증대 기대.


## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 가. 상품화 및 사업화 전략

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

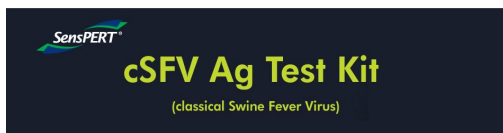
### 나. 개발 시제품

A. 돼지열병 항원, 항체 진단 및 백신감별을 위한 신속진단키트의 시제품 개요

제품명	돼지열병바이러스 항원 진단키트	돼지열병바이러스 항체진단 키트	돼지열병바이러스 백신감별 키트
용도	돼지에서 높은 유병률과 발병율, 감염성을 보이고 있는 돼지열병바이러스의 감염여부를 진단하는 항원진단 키트	돼지에서 높은 유병율과 발병율, 감염성을 보이고 있는 돼지열병바이러스의 감염여부를 판단하는 항체 진단 키트	돼지에서 높은 유병율과 발병율, 감염성을 보이고 있는 돼지열병바이러스의 백신감별을 위한 항체 진단 키트
사양	진단 가능한 진단용 싱글디바이스, 검체희석액, 드롭퍼, 설명서		
방법	검체와 검체희석액을 검사키트에 점적한 10 - 15분 내 감염여부 확인.		
시제품			

## B. 제품 설명서, 박스 및 파우치 이미지

### a. 돼지열병 항원진단 키트



#### Principles

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

#### Characteristics

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

#### Materials (10 tests/kit)

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

#### Composition

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

#### Effect

Detection of Swine fever virus antigens from swine whole blood, serum, or plasma

#### Uses

##### 1) Specimen

Swine whole blood, serum or plasma

##### 2) Test procedure

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

- e) Read the test results between 5 ~ 10 minutes.

#### Invalid results after 10 minutes.

#### 3) Interpretation of the results

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

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

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

- 1) Negative: Control line only appears.



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



- 3) Retesting

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



- b) Test line only appears.



#### 4) Further examinations

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

#### Precautions

- 1) Use for swine *in-vitro* diagnostic purposes only.
- 2) Use within 10 minutes after opening the pouch because the test kit is very sensitive to moisture and its effect may diminish.
- 3) Be careful of not touching the result window.
- 4) Every specimen should be used with different droppers.
- 5) For testing, the buffer included should be used.
- 6) Do not use specimen showing hemolysis or being contaminated with microbes, which may cause false positive or false negative result.
- 7) Deal with specimen carefully. They can deliver unknown virus or infectious bacteria.
- 8) Use disposable gloves when you suspect the

infection caused by specimen. And wash your hands later.

- 9) Dispose solid wastes after sterilizing them at 121°C for over 1 hour.
- 10) Do not use the kit when its pouch is torn, sealing is not good in shape or expiration date is passed.

#### Storage method and expiration date

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

#### Exchange

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

#### Liability

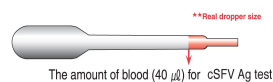
The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of this product.



Manufactured by  
**VetAll Laboratories**  
 #403 Unitechvill, 1141-2 Baeksuk-Dong, Ilsan-Gu,  
 Koyang-Si, Kyunggi-Do, 410-722 Korea  
 TEL. +82-31-9097413 FAX. +82-31-9097410





## Instruction for cSFV Ag test



- ### 1 Sampling & loading
- ### 2 Absorption
- ### 3 Buffer addition
- ### 4 Reading
- ### 5 Discard







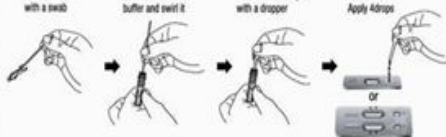
## cSFV Ag Test Kit

LOT / Lot. No. :
Expiration :





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

### 1. Test Procedure

Collect sample with a swab → Put the swab into buffer and swirl it → Take diluted sample with a dropper → Apply Drops



### 2. Interpretation of results

Positive		Invalid	
Negative			

## b. 돼지열병 항체진단 키트



### Principles

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

### Characteristics

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

### Materials (10 tests/kit)

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

### Composition

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

### Effect

Detection of Swine fever virus antibodies from swine whole blood, serum, or plasma

### Uses

#### 1) Specimen

Swine whole blood, serum or plasma

#### 2) Test procedure

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

♣ **Invalid results after 10 minutes.**

#### 3) Interpretation of the results

A purple band should appear on the control line

regardless of the test result. The presence of another band on the test line determines the result.

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

Test Line (T): The presence of antibodies of CSF disease determines the test line.

- 1) Negative: Control line only appears.



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



- 3) Retesting

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



- b) Test line only appears.



#### 4) Further examinations

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

### Precautions

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



date is passed.

#### Storage method and expiration date

The test kits stored at 2~30°C can be used for 18 months after manufacturing. **Do not keep them in a refrigerator.** However, if they are stored under cold circumstances, keep them at room temperature for 15~30 minutes before use.

#### Exchange

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

#### Liability

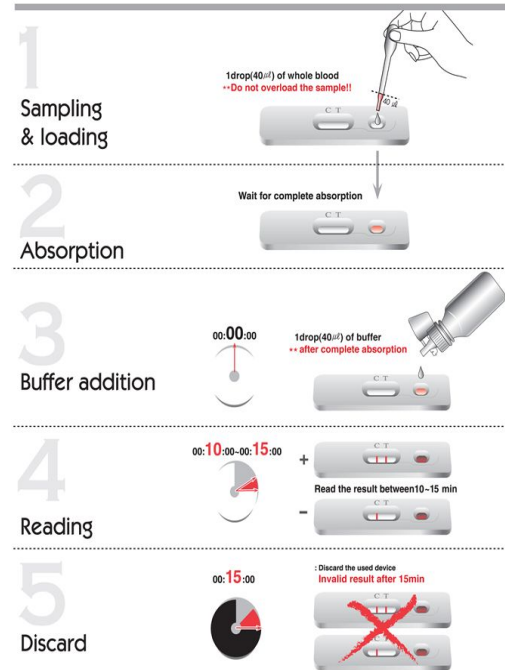
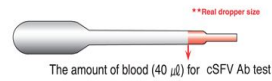
The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of this product.




Manufactured by  
**VetAll Laboratories**  
#403 Unitechwill, 1141-2 Baeksuk-Dong, Ilsan-Gu,  
Koyang-Si, Kyunggi-Do, 410-722 Korea  
TEL. +82-31-8037413 FAX. +82-31-8037410



## Instruction for cSFV Ab test








**cSFV Ab Test Kit**

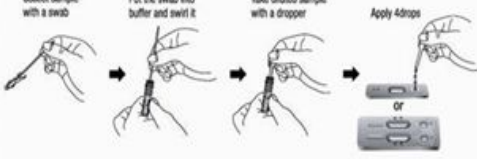
LOT / Lot. No. :      / Expiration :

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







**1. Test Procedure**

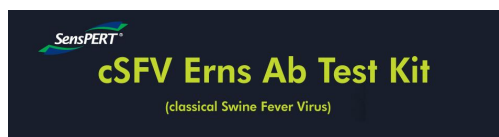
Collect sample with a swab      Put the swab into buffer and swirl it      Take diluted sample with a dropper      Apply 4drops



**2. Interpretation of results**

Positive		Invalid	
Negative			

## c. 돼지열병 백신감별진단 키트



### Principles

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

### Characteristics

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

### Materials (10 tests/kit)

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

### Composition

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

### Effect

Detection of Swine fever virus antibodies from swine whole blood, serum, or plasma

### Uses

#### 1) Specimen

Swine whole blood, serum or plasma

#### 2) Test procedure

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

♣ **Invalid results after 10 minutes.**

#### 3) Interpretation of the results

A purple band should appear on the control line

regardless of the test result. The presence of another band on the test line determines the result.

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

Test Line (T): The presence of Erns antigens of CSF disease determines the test line.

- 1) Negative: Control line only appears.



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



- 3) Retesting

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



- b) Test line only appears.



#### 4) Further examinations

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

### Precautions

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

**Storage method and expiration date**

The test kits stored at 2~30°C can be used for 18 months after manufacturing. **Do not keep them in a refrigerator.** However, if they are stored under old circumstances, keep them at room temperature for 15~30 minutes before use.

**Exchange**

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

**Liability**

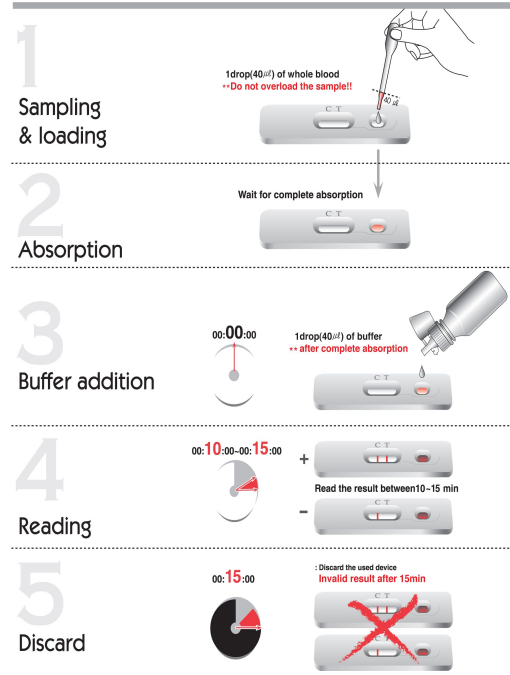
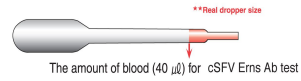
The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of this product.




Manufactured by  
**VetAll Laboratories**  
 #403 Unitechwill, 1141-2 Baeksuk-Dong, Ilsan-Gu,  
 Koyang-Si, Kyunggi-Do, 410-722 Korea  
 T/FI +R2-31-9097413 FAX +R2-31-9097410



**Instruction for cSFV Ems Ab test**








**Erns Ab Test Kit**

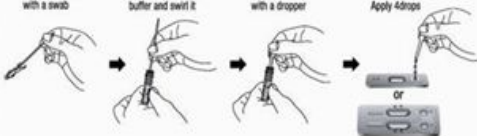
LOT / Lot. No. :      / Expiration :

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







**1. Test Procedure**

Collect sample with a swab → Put the swab into buffer and swirl it → Take diluted sample with a dropper → Apply 4drops



**2. Interpretation of results**

Positive		Invalid	
Negative			

## 다. 특허출원

### 관인생략 출원번호통지서

**출원일자** 2011.03.11  
**특기사항** 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0316)  
**출원번호** 10-2011-0021819 (접수번호 1-1-2011-0178115-98)  
**출원인명칭** 베트올(주)(1-2007-009199-2)  
**대리인성명** 유미특허법인(9-2001-100003-6)  
**발명자성명** 오호선 이현식 김정미  
**발명의명칭** 돼지열병바이러스의 탐지용 항원, 이를 이용한 항체 검출 방법, 및 이를 포함하는 탐지키트

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

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

## 제 6 장   참고문헌

- [1] B. Ngom, Y. Guo, X. Wang, D. Bi, Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review, *Anal Bioanal Chem* 397 1113-1135.
- [2] Y. Qi, B.Q. Zhang, Z. Shen, Y.H. Chen, Candidate vaccine focused on a classical Swine Fever virus epitope induced antibodies with neutralizing activity, *Viral Immunol* 22 (2009) 205-213.
- [3] F.Q. Zhang, Z.H. Li, N.Z. Zhang, [Identification and comparison of neutralizing epitopes of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus], *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45 (2005) 66-71.
- [4] A. Clavijo, M. Lin, J. Riva, M. Mallory, F. Lin, E.M. Zhou, Development of a competitive ELISA using a truncated E2 recombinant protein as antigen for detection of antibodies to classical swine fever virus, *Res Vet Sci* 70 (2001) 1-7.
- [5] T. ABRAMENKO, V. ALESHKIN, M. MYAGKOVA, A. SOLOMATNIKOVA, A. STAROV, Development of a method for express diagnosis of hog cholera, based on the latex agglutination test, *Voprosy virusologii* 44 (1999) 44-46.
- [6] B.K. Park, K.S. Lyoo, Y.H. Park, J.H. Koh, K. Seo, Host immune responses against hog cholera virus in pigs treated with an ionized alkali mineral complex, *J Vet Sci* 3 (2002) 315-319.
- [7] B. Kim, J.Y. Song, D.S. Tark, S.I. Lim, E.J. Choi, J. Kim, C.K. Park, B.Y. Lee, S.H. Wee, Y.C. Bae, O.S. Lee, J.H. Kwon, W.C. Kang, T.Y. Kim, J.H. Kim, J.H. Lee, M.I. Kang, Feed contaminated with classical swine fever vaccine virus (LOM

strain) can induce antibodies to the virus in pigs, *Vet Rec* 162 (2008) 12-17.

[8] F. Wehrle, S. Renzullo, A. Faust, M. Beer, V. Kaden, M.A. Hofmann, Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines, *J Gen Virol* 88 (2007) 2247-2258.

[9] M. Beer, I. Reimann, B. Hoffmann, K. Depner, Novel marker vaccines against classical swine fever, *Vaccine* 25 (2007) 5665-5670.

[10] V. Moennig, Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy, *Vet Microbiol* 73 (2000) 93-102.

[11] A. Boklund, S.G. Goldbach, A. Uttenthal, L. Alban, Simulating the spread of classical swine fever virus between a hypothetical wild-boar population and domestic pig herds in Denmark, *Prev Vet Med* 85 (2008) 187-206.

[12] V. Kaden, H. Steyer, J. Schnabel, W. Bruer, Classical swine fever (CSF) in wild boar: the role of the transplacental infection in the perpetuation of CSF, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52 (2005) 161-164.

[13] F. Koenen, G. Van Caenegem, J.P. Vermeersch, J. Vandenneede, H. Deluyker, Epidemiological characteristics of an outbreak of classical swine fever in an area of high pig density, *Vet Rec* 139 (1996) 367-371.

[14] T.A. Niewold, G.J. van Essen, M.J. Nabuurs, N. Stockhofe-Zurwieden, J. van der Meulen, A review of porcine pathophysiology: a different approach to disease, *Vet Q* 22 (2000) 209-212.

[15] F. Wehrle, S. Renzullo, A. Faust, M. Beer, V. Kaden, M.A. Hofmann, Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines. *J Gen Virol* 88 (2007) 2247 - .2258.



## 주 의

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