

321017-1

과
제
명
아프리카
돼지 열병
바이러스
(ASF)
진단 신속
진단 kit
개발
최종
보고
서

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004152-01

아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발 연구과제

2022.09.06

주관연구기관 / 연세대학교 원주산학협력단
협동연구기관 / (주)파이지노믹스
협동연구기관 / 에이비아비(주)
협동연구기관 / 충북동물위생시험소

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발 연구 과제”(개발기간 : 2021. 04. 01. ~ 2022. 03. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.09.06

주관연구기관명 : 연세대학교 원주신학협업연구소 (인)

협동연구기관명 : (주)페이지노믹스 (인)

협동연구기관명 : 에이비아이(주) (인)

협동연구기관명 : 충청북도동물위생시험소중부지소 (인)

주관연구책임자 : 홍민선

협동연구책임자 : 박정호

협동연구책임자 : 김동일

협동연구책임자 : 변협섭

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		가축질병대응기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		동물의약품 개발			연구개발과제번호		321017-1
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	60 %	LB0702	40 %	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	RB0202	70 %	RB0203	20 %	RB0201	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 202. 03. 31(1 년 0 개월)					
총 연구개발비		총 450,100 천원 (정부지원연구개발비: 400,000 천원, 기관부담연구개발비 : 50,100 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[<input type="checkbox"/>] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[<input type="checkbox"/>]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	국내 축산업과 관련 식품산업을 위협하는 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스 감염병의 현장 활용형 신속 진단 kit 개발용 후보물질 발굴하고 이를 이용한 정밀 검사법 및 현장 활용 가능한 검출 장비를 개발하고 유의성을 평가하여 ASF의 국가적인 대처에 기여하고자 함					
	전체 내용	<p>아프리카 돼지열병의 항원 개발 및 항원검출 항체 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - ASF 항원 대조합 단백질 클로닝/과발현/정제 - 항원 특이적 항체 개발 - ASF 항원 특이적 항체 선별 - ASF 항체 과발현 세포주 개발 및 정제 - ASF 진단용 특이항체 이용한 신속진단키트 개발 (ICT 등) - 특허 출원 및 시제품 개발 <p>2. ASF 현장 활용형의 신속 진단 kit 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time qPCR) 기법을 활용한 동물용 체외진단 primer 및 probe 개발 - 등온증폭PCR 기법에 활용할 진단 primer 및 probe 개발 - 증폭반응 및 검출이 실시간으로 가능한 휴대용 등온증폭 장치 개발 - 특허 출원 및 시제품 개발 <p>3. 아프리카 돼지열병의 현장형 신속, 정밀 분자진단 검사법 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 현장형 시료 전처리 최적화 및 표준 프로토콜 개발 - 등온증폭 기반 신속/정밀 검사법 개발: 1시간내 검출, 민감도 1000copy/g 이상 - 표준검체의 농도별 데이터 비교분석하여 최저검출한계 및 진단 기준치 제시 - 현장형 분자진단 검사법 검출 키트 특허 출원 및 시제품 개발 <p>4. 현장형 신속 진단 시스템의 현장 적용 사례 확보 및 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> - ASF 감염 돼지의 혈청 시료를 이용하여 유효성 평가 진행 - 해외 발생국 양성검체 및 발생돈의 검체 시료를 이용한 진단키트 유효성 평가 					

			- 개발된 제품의 보급화 및 활용 매뉴얼 제작
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
내용			

연구개발성과	아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 키트, 구성물, 및 장비 개발
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p><연구개발성과 ></p> <ul style="list-style-type: none"> -아프리카 돼지 열병 바이러스 유래 재조합 항원 특허 3건 -아프리카 돼지 열병 신속 진단 관련 논문(SCI) 및 포스터 발표 3건 -연구개발과정 중 전문인력 양성을 통한 고용창출 2명 -지자체 등 아프리카 돼지 열병의 진단 및 방역대책에 관한 정책제안 1건 -연구개발한 시제품등 제품화 2건 -개발된 제품의 보급 및 활용을 위한 기술인증 3건 <p><활용계획 및 기대효과></p> <ul style="list-style-type: none"> - 아프리카 돼지열병의 국내 발병에 대한 현장 신속 진단체계 구축에 기여 - 아프리카 돼지열병 진단을 위한 항원 및 단클론 항체 발굴 및 세포주 생산 - 아프리카 돼지열병 진단의 real-time qPCR probe 와 primer 발굴 - 아프리카 돼지열병 진단의 등온PCR probe 와 primer 발굴 - 아프리카 돼지열병 진단 시료 국산화 - 아프리카 돼지열병 현장진단 신속 키트 및 디바이스 개발기술 국산화 - 아프리카 돼지열병의 해외유래 유입시 신속진단 및 방역체계에 기여 - 개발된 시료 전처리법과 진단검사법은 다른 가축 전염병에 확대 적용 기대
---------------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	
-----------------------	--

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1	3										
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)	아프리카 돼지열병			바이러스		진단 kit		특이항체		유전자증폭		
영문핵심어 (5개 이내)	African Swine Fever			Virus		Diagnostic Kit		Specific antibody		Gene amplification		

< 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

1) 연구개발과제의 개요

- 아프리카 돼지열병은 치사율과 감염성이 매우 높고 출혈이 특징적인 돼지의 전염병으로 국제수역 사무국(OIE)이 지정한 중요 돼지 질병이자 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류되어 있음
- 2018년 중국에서 아프리카 돼지열병이 처음으로 발생한 이후, 북쪽 몽골과 남서쪽 베트남 등으로 거침없이 전파되고 있으며, 국내에서도 2019년 경기도 파주 소재 양돈 농장을 시작으로 현재까지 경기도 및 강원지역에서 발병이 이어지고 있음
- 2020년 12월 28일 강원도 영월에서 발견된 멧돼지 폐사체에서 아프리카 돼지 열병 바이러스가 검출되어 국내감염지역이 점차 확대되고 있음
- 아프리카 돼지열병의 발생은 양돈 농장의 막대한 손실발생은 물론이고 축산업, 식품산업, 관련 가공업 등 국가 경제와 산업에 심각한 큰 영향을 미침
- 특히, 아프리카 돼지열병 바이러스 감염에 대한 예방 백신이 없기 때문에 신속하고 정확한 진단이 아프리카 돼지열병 바이러스 감염병에 대한 방역 및 관리에서 제일 중요함
- 현재 아프리카 돼지열병의 검출법으로는 PCR을 비롯하여 직접면역형광법(DIFT), 항원/항체 검출 ELISA 등이 있음. PCR은 검출 준비에 시간이 많이 소요되고 실험실적 장비와 전문인력이 필요하다는 한계가 있으며, 항원/항체 기반의 간이진단키트는 민감도와 특이도가 불충분하여 모두 현장 진단에 활용되기 어려운 상황임



그림 2 아프리카돼지열병 진단 신속 진단 키트 개발연구 모식도

- 따라서 국내에서 아프리카 돼지열병을 현장에서 신속하고 간편하게 진단하고 분석할 수 있는 현장형 실시간 검출 기술의 개발이 절실함
- 새로운 현장진단 시스템은 신속한 검출 시간, 민감한 검출 능력, 다양한 시료의 적용 가능성, 미숙련자도 현장에서 사용 가능한 간편함이 모두 충족되어야 함
- 저비용, 소규모, 폐기가 용이한 현장진단 시스템의 구축으로 방역 지역간 이동을 최소화시켜야 함
- 민감도와 특이도가 확보된 특이 항원과 항체를 개발하고 이들을 이용한 현장진단 ELISA 키트 등을 구축하고자 함
- 최근 해외에서 스마트 real-time PCR 장비가 개발되었으나 높은 장비 가격으로 인해 국내 방역 현장에 보급이 어려울 것으로 예상됨
- 이에 기존의 real-time PCR보다도 빠르고 비전문가도 현장에서 수행할 수 있는 현장형 실시간 중합효소연쇄반응(real-time qPCR)기법을 활용한 동물용 체외진단 시약을 개발하여 간이-신속 진단 키트 및 검출 장비 개발과 보급이 필요함

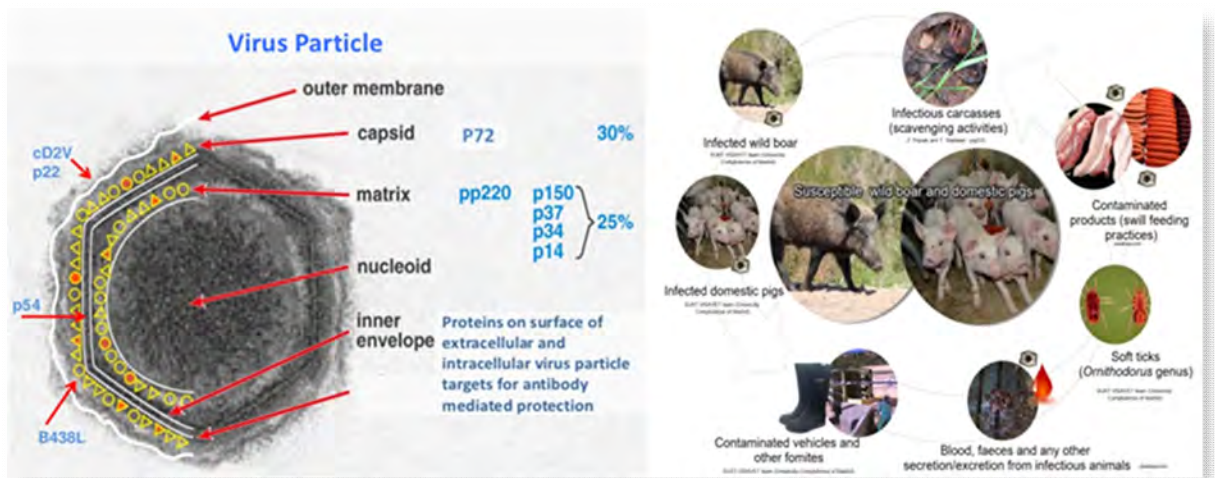
- 개발한 신속진단키트의 보급 및 활용을 위해 국가인증기관을 통한 아프리카 돼지 열병 바이러스 감염 돼지의 혈청 시료를 이용한 유의성 평가 및 매뉴얼 제작도 필요함

2) 연구개발과제의 국내·외 현황

가. 아프리카 돼지열병 현황

(1) 아프리카 돼지열병 원인체 및 자연숙주

- 원인체는 아프리카돼지열병바이러스(ASFV, African swine fever virus)는 아스파바이러스과 (*Asfarviridae*), 아스피바이러스속(*Asfivirus*)에 속하는 약 200nm정도의 DNA 바이러스임
- ASFV는 유전자 염기서열분석을 통하여 총 23개의 유전형(genotype)으로 구분되어 있음
- 바이러스에 50개 이상 구조 단백질 (Structure protein)로 구성되어져 있으며 림프조직에 친화성이 높아 단핵구, 대식세포가 표적이 됨
- 바이러스 단백질은 공통적으로 구조 단백질인 p32, p62, p54 및 p72의 단백질들과 capsid 구성 단백질이라고 알려진 VP72/73 단백질의 항원성이 높은 것으로 알려져 있음
- 기존의 해외에서 VP72/73을 이용한 ELISA kit와 p32, p62 및 p72을 이용한 ELISA kit가 상용화되고 있음.



<그림 3 ASFV 구조와 주요단백질(왼쪽) 및 전파경로(오른쪽)>

- 아프리카지역의 야생돼지인 흑멧돼지(Wartog), Giant froset hog, bushpig는 ASFV에 감염되어도 임상증상이 없으며 ASFV의 자연숙주로서 전파역할을 하고 있음
- ASFV는 또한 진드기에 의해 전파될 수 있는 절족동물매개성 질병임. 참진드기 중 오르니토도로스(Ornithodoros)속의 연진드기(soft tick)가 매개함
- 아프리카 돼지열병 바이러스를 매개하는 연진드기는 지금까지 Species 별로 서식지가 구별되어 있음. 예를 들면 *O. erraticus*는 스페인과 러시아 등, *O. moubata*는 동남 아프리카에서 그리고 *O. puertoicensis*는 카리브해 지역에서 등으로 구별되어 지고 있음
- 아프리카 발병 지역에서는 야생돼지-연진드기-일반식용돼지 사이의 감염고리가 형성되어 있어 전파되고 있으며, 연진드기가 없는 지역에서는 감염된 돼지와 건강한 돼지와의 접촉에 의한 전파가 이루어지고 있음

(2) 아프리카 돼지열병의 발생현황

- 아프리카 돼지열병은 1921년 아프리카 케냐에서 야생아프리카 멧돼지(Wild african suids)로부터 집에서 사육되는 돼지에 전파되어 발생하였음 (Montgomery, 1972)
- 1970년 대 쿠바, 브라질, 도미니카 공화국 및 하이티 등에서 아프리카 돼지열병이 발생하였으나 강력한 박멸대책으로 근절되었음
- 1957년 포르투갈의 리스본에 아프리카 돼지열병이 발생한 이후 서유럽으로 전파되었음

- 당시 100% 폐사하는 무서운 돼지전염병이 발생하게 되었음(Manso Ribeiro 등, 1958)
- 또한 1964년에 프랑스에서, 1967년에 이탈리아, 1978년 말타, 1985년 벨기에, 그리고 1986년에 네덜란드에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 서유럽 전체에 전파되어 발생하였음
- 특히 포르투갈과 스페인에서는 1995년까지 약 40년간 발생하였으며, 강력한 박멸전략을 통해 아프리카 돼지열병 근절을 하였음



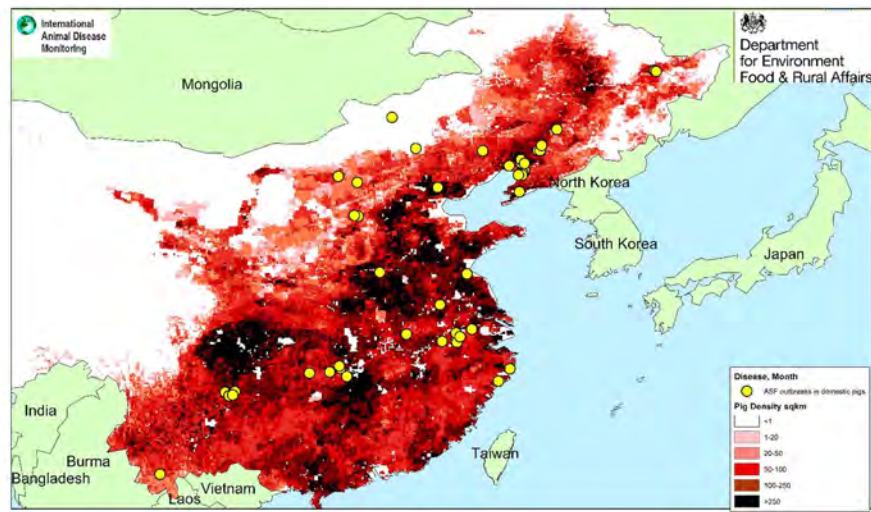
<그림 4 국내외 아프리카 돼지열병 발병 현황>

- 2007년 러시아 및 코카서스(흑해와 카스피해 사이에 있는 구소련 지역)에서 아프리카 돼지열병이 발생하였고 2008년 체첸, 그루지아, 아제르바이잔에서도 발생하였음
- 다음 해인 2009년 5월부터 2010년 12월까지 러시아에서 15건이 발생하였음
- 2011년 5월까지 이 지역에서 20건 이상 발생하여 FAO에서 아프리카 돼지열병은 전 세계를 위협하고 있는 것을 공포함
- 2007년 조지아(Georgia)지역에서 발생한 아프리카 돼지열병은 역학조사 결과 남부 아프리카에서 선박으로 유래된 잔반을 돼지에 먹여 발생되었으며, 매년 350km씩 동북진하고 있는 것으로 발표하였음
- 2011년에는 러시아 남부지역에서 3천km 북쪽인 핀란드의 Murmansk의 항구지역에서 아프리카 돼지열병이 발생하기도 하였음
- 러시아와 인근 국가인 에스토니아, 라트비아, 벨라루스, 리투아니아, 루마니아, 체코에서는 2007년 발생 이후 아직까지 산발적으로 발생하고 있음
- 러시아에서는 2011년 아프리카 돼지열병 박멸을 위해 약 4억달러(약 4천400억원)의 경비를 투입하고 있음
- 2013년 11월 러시아와 중국의 국경지역인 Amur지역에서 아프리카 돼지열병이 발생하였음
- 2014년 폴란드에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 큰 충격을 주었는데, 2014년 7월 23일, 8월 8일 및 2015년 1월 31일 국경에서 3-12km 떨어진 지역에서 각각 발생하였음. 2019년 지금까지 발행하고 있는 실정임
- 2017년 4월에는 헝가리에서 아프리카 돼지열병이 발생하였으며, 잔반이 오염원으로 추정되고 있음



<그림 5 러시아 및 그 주변국가의 아프리카 돼지열병 발병 상황>

- 2018년 8월 1일 중국 랴오닝성 선양시 선베이신구 소재 양돈장에서 감염된 돼지 47마리가 모두 폐사하였음. 바이러스를 분리하여 유전자 검사결과 러시아에서 발생한 유전형과 100% 일치하였으며, 러시아와 동유럽에서 현재 발생하고 있는 그루지아변종에 속하는 것이 확인됨
- 중국은 31곳의 성·구·직할시 가운데 25곳에서 아프리카 돼지열병이 발생하여 전국적으로 퍼져 있음. 그 동안 동남아시아에서 아프리카 돼지열병이 발생하지 않았는데, 베트남에서 발생하여 아시아 전역으로 확산할 것에 대한 우려가 매우 높음
- 2019년 2월 19일 영국 로이터통신 등에 의하면, 베트남 전역의 8개 돼지 사육농장에서 아프리카 돼지열병이 발병하였다고 함. 구체적인 발생지역은 베트남 북부 흥옌(Hung Yen)과 타이빈(Thia Binh) 지역이며, 베트남 수도인 하노이에서 직선거리로 25-26km 떨어진 곳임. 베트남 정부는 이 지역 농장들의 돼지를 모두 살처분 하였음



<그림 6 중국에서 아프리카 돼지열병의 발병 상황 (FAO 자료)>

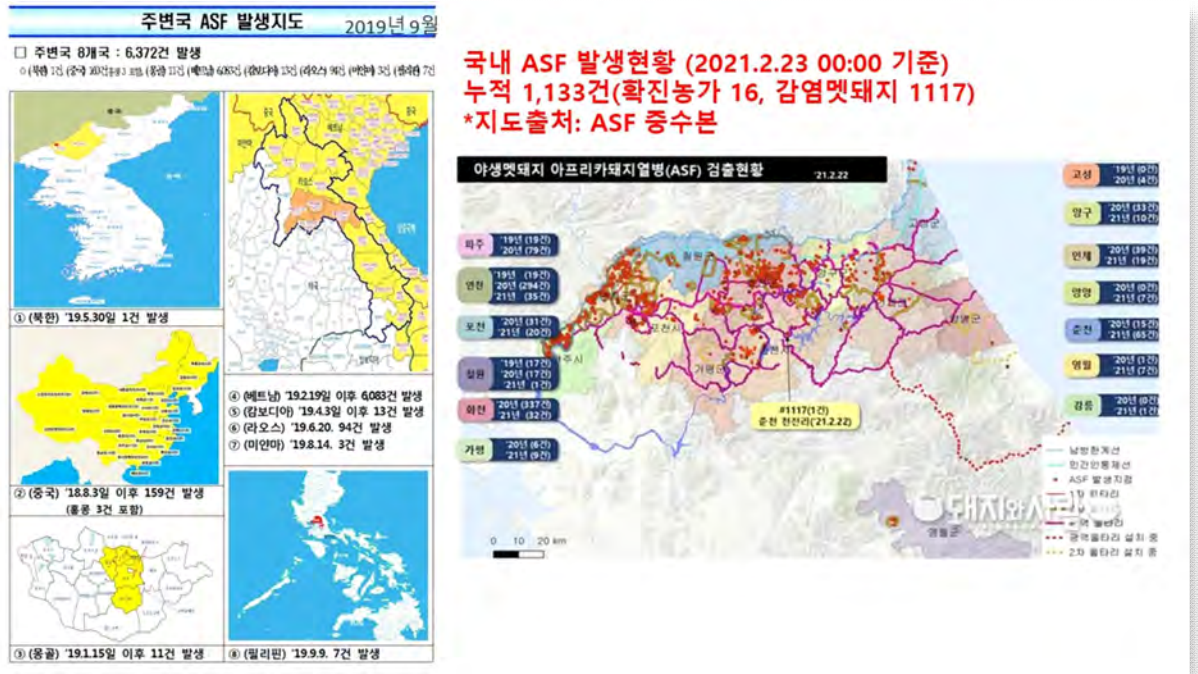
- 베트남에서의 아프리카 돼지열병의 확산경로는 아직 정확하게 밝혀지지 않았으며, 베트남 동물 검역부는 중국 춘절을 맞아 중국과 베트남과의 관광객의 이동과 화물 수출입이 늘면서 아프리카 돼지열병도 함께 전파되었을 것으로 추정하고 있음. 동시에 아프리카 돼지열병에 감염된 중국의 돼지와 접촉한 철새가 바이러스를 전파했을 수 있는 가능성도 고려하고 있음
- 2018년 중국에서 아프리카 돼지열병이 처음으로 발생한 이후 북쪽 몽골과 남서쪽 베트남 등으로 거침없이 전파되고 있는 상황임
- 유엔식량농업기구(FAO)는 최근 베트남에서 아프리카 돼지열병이 발생한 직후 '베트남과 국경이 맞닿아 있는 라오스·캄보디아·태국으로 확산될 가능성이 높고 경고함

- 베트남의 발생과 관련하여 필리핀은 베트남산 돼지고기 및 관련 가공품의 수입을 전면 금지하였음. 일본도 냉동·냉장 기술의 발전으로 아프리카 돼지열병 바이러스가 더 오래 생존할 수 있어, 국경검역을 강화하고 있음
- 2019년 농식품부 보고에 따르면 아프리카 돼지열병 발생국은 중국, 베트남을 포함 43개국임

<표 5. 아프리카 돼지열병의 발생 국가>

대륙	발생국 (45개국)
아시아 (3개국)	중국, 몽골, 베트남, 북한, 대한민국
아프리카 (29개국)	가나, 기니비사우, 나미비아, 나이지리아, 남아프리카 공화국, 르완다, 마다가스카르, 말라위, 말리, 모잠비크, 베냉, 부룬디, 부르키나파소, 세네갈, 앙골라, 우간다, 잠비아, 중앙아프리카공화국, 짐바브웨, 차드, 케메룬, 카보베르데, 케냐, 코트디부아르, 콩고공화국, 콩고민주공화국, 탄자니아, 토고
유럽 (13개국)	라트비아, 러시아, 루마니아, 리투아니아, 몰도바, 에스토니아, 우크라이나, 이탈리아, 체코, 폴란드, 헝가리

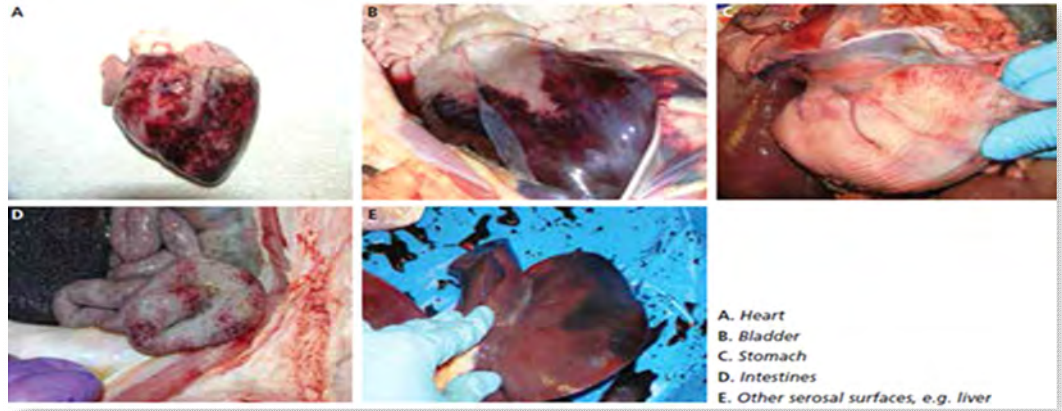
- 2019년 9월 기준 우리나라 주변 8개국에서 총 6,372건의 ASF발생이 보고되고 있음
- 국내에서는 2021년 2월 기준 경기 및 강원 북부 지역을 중심으로 누적 1,133건 발병이 현재까지 이어지고 있음



<그림 7 우리나라 주변 8개국 및 국내 ASF 발생 현황>

(3) 아프리카 돼지열병의 임상증상

- 아프리카 돼지열병의 일반적인 특징은 모든 연령의 돼지가 감염될 수 있고 감염된 돼지들이 갑자기 폐사하는 것임
- 특히 어떤 국가나 지역에 최초로 발생하는 경우 보통 짧은 열성질환 후 높은 폐사율이 나타나는 것이 특징임. 그러나 발생 초기에 특히 이환된 돼지의 수가 적을 때는 진단이 쉽지 않고 발생이 없던 농장에 소량의 바이러스가 감염되었을 때는 발열과 약간의 출혈성 림프절이 있으면서 폐사하는 것을 제외하고는 높은 폐사율을 일으키지도 않을 뿐만 아니라 특징적인 임상 증상도 안 나타날 수 있음
- 돈사 내에서 바이러스가 순환함에 따라 보다 높은 폐사율과 특징적 임상증상 및 병변이 관찰될 수 있는 폭발적인 감염은 보통 바이러스가 유입된 지 며칠 후에야 관찰될 수 있음. 따라서, 주변 농장이나 지역에 동 질병이 발생하고 있는 고위험 지역에서는 발열을 보이며 죽은 모든 돼지에 대해서 아프리카돼지열병에 대한



<그림 8 아프리카 돼지열병에 의한 출혈성 병변>

감염 진단 검사를 반드시 실시해야 함

- 아프리카 돼지열병의 임상증상은 바이러스의 병원성, 감염된 돼지의 품종, 바이러스 노출 경로, 감염량 및 그 지역에서의 풍토병 상태 등과 같은 요인들에 따라 임상증상과 병리학적 병변이 다양하게 나타날 수 있음



<그림 9 아프리카 돼지열병에 의한 증상과 병변>

- 구체적으로는 심급성형(Peracute), 급성형(Acute), 아급성형(Subacute), 만성형(Chronic)으로 분류되며, 이중 급성형은 ASF에서 가장 일반적으로 나타나는 유형이며 고병원성이나 중병원성 바이러스에 의해 유발됨. 거의 대부분의 감염된 돼지는 발열이 시작된 지 1주일 후에 쇼크로 죽으며 일반적으로 입과 코 주변에 기포가 관찰됨. 급성형의 병변으로는 총혈성 비장비대증, 출혈성 림프절, 각종 장기에 점상출혈 등이 나타남

(4) 아프리카 돼지열병에 대한 대책

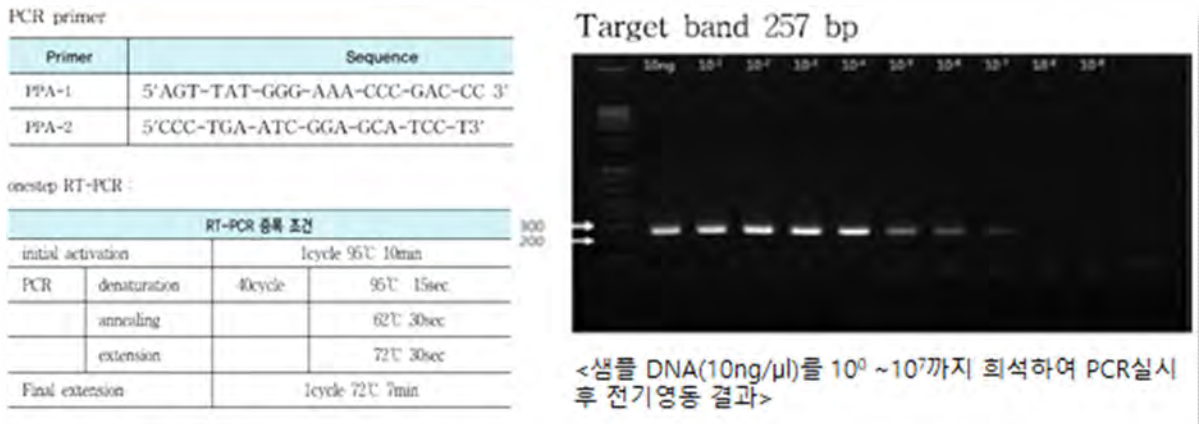
- 아프리카 돼지 열병이 확산되고 아시아 대륙까지 전파되면서 과거 제대로 진행되지 못했던 백신에 대한 개발 연구에 이목이 집중되고 있으나 아직 개발된 치료제가 없는 상태임
- 이에 따라 바이러스가 국내에 유입되지 않도록 하는 것이 최선이나, 유입시 이를 빠른 시간 내에 진단하고 확인하여 이를 격리시켜 ASF의 확산을 막을 필요가 있음
- 최근 중국에서 발생한 이후 베트남에서도 발생하고 있으며, 우리나라에서도 2019년 9월 이후 현재까지 발병이 지속되고 있기에, 철저한 방역대책수립이 필요한 시기임
- 첫 번째 대책은 발생국가로부터 돼지고기 및 가공식품의 국내 유입을 철저히 막아야 함. ASF는 냉장고기에 110일, 소금에 절인 고기에 182일, 건조고기에 300일, 냉동고기에 1,000일 동안 살아

있는 특이한 바이러스이므로 돼지고기 및 축산물을 통한 유입을 통제가 필요함

- 다음은 ASF 발생국가(약 45개국)의 발생지역 양돈장 방문을 금지하고, 발생국가 여행 후 돼지나 멧돼지와와의 접촉을 피해야 함. 특히 바이러스가 야외에서 오랫동안 생존할 수 있는 특성이 있어 더욱 주의해야 함
- 아프리카 돼지열병의 주된 경로가 잔반을 통하여 일어나는 것으로 알려져 있어, 잔반 급여시 반드시 열처리해야 하며, 철저한 관리가 필요함
- 사육농가에 대한 철저한 모니터링 체계의 구축이 필요함. 아프리카 돼지열병의 국내 유입을 방지하기 위한 전 국가적인 방역시스템의 가동과 긴급행동지침을 배포하여 효과적인 방제가 가능할 수 있도록 준비해야 함

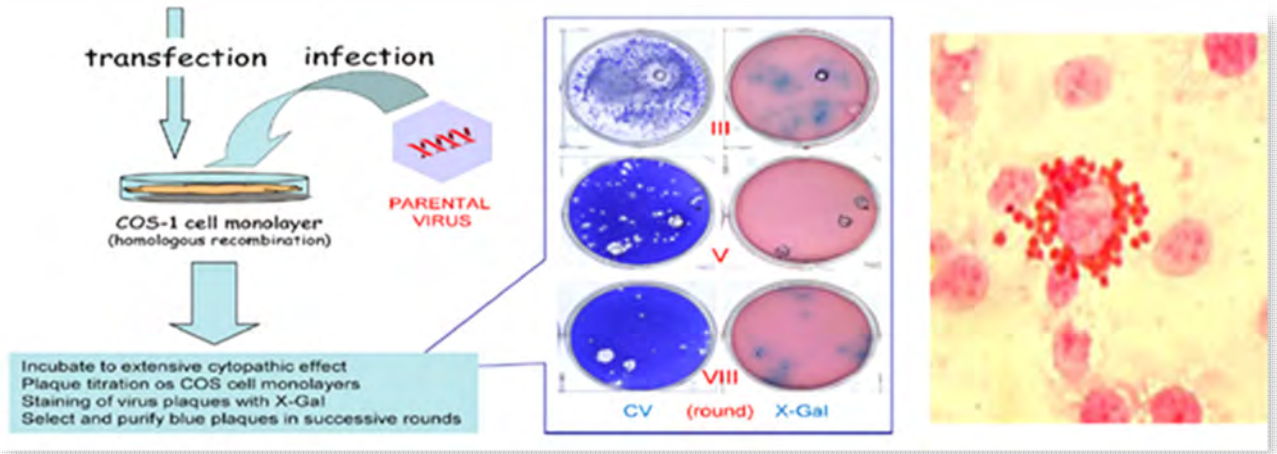
(5) 아프리카 돼지열병 실험실 진단

- 아프리카 돼지열병에 대한 백신이 없기 때문에 신속하고 정확한 진단이 아프리카 돼지열병에 대한 방역 및 관리에서 제일 중요함
- 농림축산검역본부에서 제시하고 있는 아프리카 돼지열병 표준 진단은 PCR 진단을 바탕으로 한 conventional PCR 과 real-time qPCR을 제시하고 있음



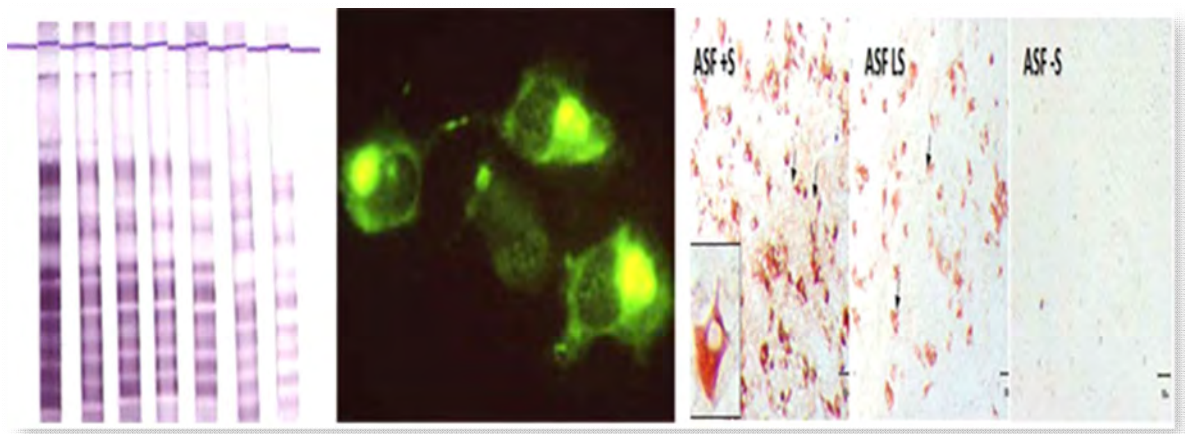
<그림 10 아프리카 돼지열병 바이러스의 PCR을 통한 유전자 진단 검사 및 결과>

- 하지만 PCR 및 real-time qPCR은 검체 배양에서 검사까지 시간이 소요되며, 개인 휴대가 어려운 실험실 수준의 장비가 필요함. 따라서 개인보급형 및 현장검사용으로 보완된 장치 개발 및 보급 시급함
- 바이러스 검출법으로는 PCR을 비롯하여 직접면역형과법(DIFT), 항원 검출 ELISA 등이 있음
- 가검물에서 직접 바이러스를 분리할 수 있으며, 혈구흡착검사(hemadsorption assay, HDA)를 통해 ASFV의 존재 여부를 확인할 수 있음
- 바이러스를 분리하기 위한 검체는 초기 발열증상있는 돼지로부터 채취한 혈액이 이상적이며, 비장 및 림프절과 같은 장기는 냉장상태로 실험실로 의뢰되어야 함



<그림 11 ASFV 분리배양 과정과 ASFV 혈구흡착검사 결과>

- 혈구흡착검사의 장점: 바이러스 분리는 ASFV를 분리배양하여 원인바이러스를 검출하는 가장 확실한 방법임. HAD의 경우 체액을 이용한 다른 감염검사에서 감염이 의심되는 경우, 감염 확진검사법으로 사용할 수 있음
- 혈구흡착검사의 단점: 바이러스 분리배양을 위하여 전문인력과 특수 실험실이 필요하고, 분리배양을 위하여 primary PBMC에서 macrophage 세포를 분리하여 배양하여야 하기 때문에 배양과정의 매우 까다로움
- 아프리카 돼지열병에 감염된 돼지의 혈청을 이용한 항체 검출법은 OIE-ELISA(간접법)와 상용화된 항체검출용 ELISA를 이용하여 1차 선별검사를 진행하고, 면역탁본법(IB), 면역과산화효소시험(IPT, Indirect Immunoperoxidase tests), 간접형광항체법(IFA, Indirect Immunofluorescence assay)를 통해 최종적으로 확인할 수 있음



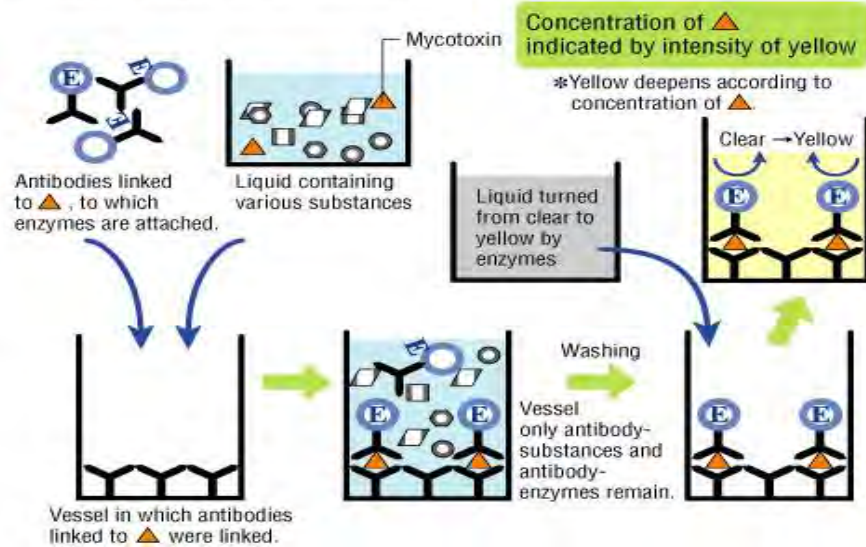
<그림 12 아프리카 돼지열병에 대한 검사법(IB, IFA, IPT)>

- ASFV에 대한 IB, IFA, IPT 검사법은 국가방역기관에서 확진검사용으로 적합하지만, 숙련된 전문인력과 이동이 어려운 장비가 필요하기에 현장검사용으로는 부적합함
- ELISA를 이용한 항체 검사용 혈청은 감염 후 8-12일 이내의 회복기 돼지의 혈청검체가 좋으며, 용혈된 검체는 위양성 반응을 나타낼 수 있으므로 판독에 주의해야 함
- ASF는 질병의 진행단계가 빠르고 다양하여 불현성 감염된 돼지도 존재할 수 있으므로 실험실에서는 반드시 항원 및 항체 검사를 동시에 수행하여 정확하게 감염여부를 검사해야 함

(6) 등온증폭 기반의 현장 신속검사법 개발 현황

- 현장 신속검사 (Point of Care Test: POCT)는 대부분 핵산 등온증폭기술을 적용한 것으로 등온증폭(LAMP, loop-mediated isothermal amplification) 방식이 대표적임

Principle of Enzyme-Linked Immunosolvent Assay (ELISZA)



<그림 13 아프리카 돼지 열병에 대한 항체검출용 ELISA>

- 등온증폭방식은 진단검출의 표적이 되는 핵산에서 6개의 부분을 선택해야 하는 점에서 프로브의 제작이 다소 까다롭고 짧은 길이의 표적에는 적용할 수 없는 단점이 있으나, 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때 표적 핵산에 대한 민감도와 특이성이 매우 높음
- 특히, 등온에서 유전자 증폭이 이루어지므로 온도 조절은 필요없으며 온도 변화에 따른 핵산의 손상이 없기 때문에 증폭 효율이 매우 높으며, 상대적으로 간단한 장비만을 가지고 짧은 반응시간 내에 핵산 증폭이 가능함
- 따라서 등온증폭기술은 현장성이 높지만 민감도/특이도가 낮은 신속진단키트나 민감도가 높지만 시간이 오래걸리고 실험실정 장비가 필요한 real-time qPCR을 대체할 수 있는 현장형 기술임
- 등온증폭방식은 가닥 변위 활성이 높은 *Bst polymerase*를 이용하여 표적이 되는 핵산에서 6개 부분을 인식하도록 고안된 4개의 프로브 (outer primer F3, B3, inner primer FIP, BIP)에 의해 루프구조를 만들어 사슬치환반응으로 증폭이 이루어짐
- 등온증폭방식을 이용하여 증폭된 산물은 반응 부산물인 피로인산 마그네슘 (magnesium pyrophosphate) 침전에 의한 탁도 측정, 형광 염료인 SYBR Green 등을 이용한 형광 검출, 전기영동 등의 방법을 통해 확인할 수 있기에 결과 분석의 확장성이 높다는 장점이 있음
- 이 중, 등온증폭기반의 탁도 측정법과 형광 측정법은 실시간으로 증폭 산물을 검출할 수 있기 때문에 현장 적용성을 극대화할 수 있는 방법임

○ 연구개발과제 최종 목표

국내 축산업에 심각한 경제적 손실을 야기하고 있는 아프리카 돼지열병(ASF) 바이러스 감염의 위협에 신속하게 대처할 1)ASF 항원과 항체 후보물질 발굴과 2)핵산 증폭기술에 활용할 probe와 시약을 개발하고자 함. 3)개발한 후보물질을 적용하여 현장 활용형 신속 진단 키트를 제작하고 4)키트의 국가인증기관을 통한 유의성 평가를 실시하고자 함. 이를 통해 국내기술로 자체 개발한 ASF 신속진단키트를 보급하고 국내외 ASF의 효과적인 방역대처에 기여하고자 함

○ 연구개발과제 필요성

- 아프리카 돼지 열병 (African Swine Fever, ASF)은 치사율과 감염성이 매우 높고 출혈열이 특징적인 돼지의 전염병으로 국제수역사무국(OIE)이 지정한 중요 돼지 질병이자 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류되어 있음

- 2018년 중국에서 아프리카 돼지열병이 처음으로 발생한 이후, 북쪽 몽골과 남서쪽 베트남 등으로 거침없이 전파되고 있으며, 국내에서도 2019년 경기도 파주 소재 양돈 농장을 시작으로 현재까지 경기도 및 강원지역에서 발병이 이어지고 있음
- 2020년 12월 28일 강원도 영월에서 발견된 멧돼지 폐사체에서 아프리카 돼지 열병 바이러스가 검출되어 국내감염지역이 점차 확대되고 있음
- 아프리카 돼지열병의 발생은 양돈 농장의 막대한 손실발생은 물론이고 축산업, 식품산업, 관련 가공업 등 국가 경제와 산업에 심각한 큰 영향을 미침
- 특히, 아프리카 돼지열병 바이러스 감염에 대한 예방 백신이 없기 때문에 신속하고 정확한 진단이 아프리카 돼지열병 바이러스 감염병에 대한 방역 및 관리에서 제일 중요함
- 현재 아프리카 돼지열병의 검출법으로는 PCR을 비롯하여 직접면역형광법(DIFT), 항원/항체 검출 ELISA 등이 있음. PCR은 검출 준비에 시간이 많이 소요되고 실험실적 장비와 전문인력이 필요하다는 한계가 있으며, 항원/항체 기반의 간이진단키트는 민감도와 특이도가 불충분하여 모두 현장진단에 활용되기 어려운 상황임
- 따라서 국내에서 아프리카 돼지열병을 현장에서 신속하고 간편하게 진단하고 분석할 수 있는 현장형 실시간 검출 기술의 개발이 절실함
- 새로운 현장진단 시스템은 신속한 검출 시간, 민감한 검출 능력, 다양한 시료의 적용 가능성, 미숙련자도 현장에서 사용 가능한 간편함이 모두 충족되어야 함
- 저비용, 소규모, 폐기가 용이한 현장진단 시스템의 구축으로 방역 지역 간 이동을 최소화시켜야 함
- 민감도와 특이도가 확보된 특이 항원과 항체를 개발하고 이들을 이용한 현장진단 ELISA 키트 등을 구축하고자 함
- 최근 해외에서 스마트 real-time PCR 장비가 개발되었으나 높은 장비 가격으로 인해 국내 방역 현장에 신속한 보급은 어려움
- 이에 기존의 real-time PCR보다도 빠르고 비전문가도 현장에서 수행할 수 있는 현장형 실시간 중합효소연쇄반응(real-time qPCR)기법을 활용한 동물용 체외진단 시약을 개발하여 간이-신속 진단 키트 및 검출 장비 개발과 보급이 필요함
- 개발한 신속진단키트의 보급 및 활용을 위해 국가인증기관을 통한 아프리카 돼지 열병 바이러스 감염 돼지의 혈청 시료를 이용한 유의성 평가 및 매뉴얼 제작도 필요함

○ 연구개발과제 단계별 목표

- ASF 항원 단백질 유전자 확보(항원 클로닝) 및 재조합 항원 단백질 생산 및 정제
- 항원에 대한 특이 항체 개발 및 항체 대량 생산 및 정제 시스템 구축
- 항원/항체 검출 신속진단 키트 개발
- 현장형 시료 전처리 최적화 및 표준 프로토콜 개발
- real-time qPCR(RT-PCR, qPCR, RT-qPCR)용 primer 및 probe 개발
- 실시간 중합효소연쇄반응(real-time qPCR) 검사법 개발
- 실시간 등온증폭법(real time RPA, RPA, recombinase polymerase amplification) 기반 아프리카 돼지열병 현장 진단용 신속/정밀 분자시스템 개발
- 개발한 검사법의 진단 분석 기준치 제시
- 개발한 검사법들의 비교 우위 평가를 통한 최적의 진단 검사 시스템 제시
- 개발한 현장진단 플랫폼의 국가인증기관, 정부검사기관, 축산농장, 및 국내외 적용을 통한 실증사례 확보하고 유효성 평가
- 개발된 제품의 보급과 사용법 매뉴얼 작성 및 배포
- 아프리카 돼지 열병 바이러스 감염병 사태에 신속하게 대처할 수 있는 정책 제안

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

높음. 하지만 동물을 숙주세포로 하는 바이러스의 단백질은 대장균 세포의 발현을 최적화 하기 위해서는 대체로 300개 이하의 아미노산으로 구성된 단백질 절편이어야 대체로 성공적으로 생산됨

- 단백질 구조에 관한 전문적인 지식과 구조분석을 기반으로 종간 유사성이 높고 구조적으로 안정한 바이러스 항원 단백질 절편을 선별함
- 동물을 숙주세포로 하는 ASFV 항원 단백질의 생산 효율성 증대를 위해 재조합 발현 유전자를 대장균 세포에서 번역 활용도가 높은 유전자 코돈으로 재조합 발현 유전자를 최적화함
- 재조합 바이러스 항원 단백질 생산의 성공을 위해 다양한 길이의 constructs 제작하고 대장균 세포에서 발현 조건을 스크린하여 최적화 함 (세균 배양 온도, 시간 및 배지 다양화)
- 발현된 재조합 ASFV 항원 단백질의 생물리학적 성질을 Fast protein liquid chromatography를 이용하여 순수하게 분리 정제하고 정제 결과를 SDS-PAGE를 통해 순도 및 크기를 실험적으로 분석하고 수용상태 안정성을 겔/이온 크로마토그래피 등을 이용하여 확인함 (Differential scanning calorimetry) 및 세포생물학적실험법으로 확인함



그림 17 최적화된 재조합 ASFV p72 항원 단백질 생산 결과

다. ASFV p72 항원 생산 및 유효성 평가

- 아프리카 돼지 열병 바이러스의 p72 항원의 일부 절편을 재조합 단백질 항원으로 대장균에서 생산하고자 5개의 발현 constructs 제작하였고 그 중 한 개가 성공적으로 발현하여 정제됨
- 대장균 1리터 배양하였을 때 약 4 mg의 ASFV p72 단백질이 순수하게 분리 정제 됨.
- 상업용 ID Screen ASFV indirect ELISA kit를 이용하여 정제된 ASFV p72 단백질의 아프리카 돼지 열병 진단의 유효성을 비교 평가하여 탁월한 양성 반응성과 음성 비반응성을 확인하여 위양성 선별력도 검증함.
- 이에 재조합 ASFV p72 항원 단백질 절편의 선택적 진단 유효성을 분석함



그림 16 재조합 ASFV p72 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

- 재조합 ASFV p72 항원 단백질 특이적인 단클론 항체의 생산과 상업적 활용을 위해서는 10 mg 이상의 순수하며 안정한 단백질이 필요하므로 재조합 대장균 세포주 스크린과 정

제과정을 최적화해야 함. 10개의 대장균 세포주를 스크린하고 각 2회 이상의 정제를 실시하여 최상의 생산율을 지닌 재조합 ASFV p72 항원 생산 대장균 세포주를 획득하고 저장함

- 재조합 ASFV p72 항원 단백질 생산 및 정제 과정을 5회 실시하여 최적화함
- 상업용 생산을 고려하여 연구원들간의 생산 효율성도 비교하며 생산 과정을 최적화 함

라. ASFV p104 항원 생산 및 유효성 평가

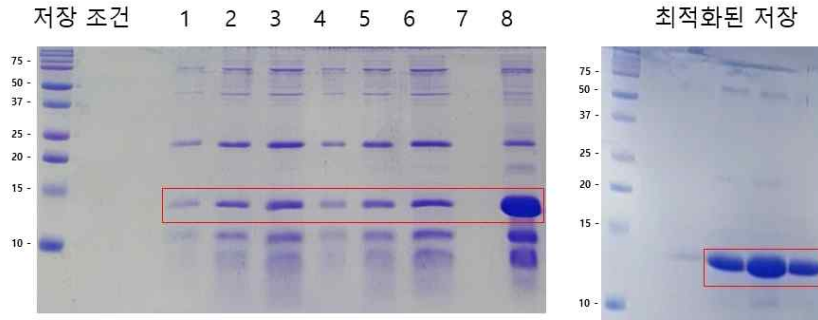


그림 19 재조합 ASFV p104 항원 단백질 저장 최적화 스크린 및 결과

- ASFV 유래 p104 항원 단백질의 일부를 선택하여 재조합 형태로 대장균 세포에서 생산하고자 3개 재조합 단백질 발현 constructs 제작하였고 두 개가 발현되었으나 정제과정 중 비특이적 단백질 분해 현상으로 한 개만 성공적으로 정제됨
- 재조합 대장균 세포 1리터를 배양하여 48시간의 정제과정을 통해 약 10 mg의 ASFV p104 단백질이 순수하게 분리 정제 됨.
- 상업용 ID Screen ASFV indirect ELISA kit를 이용하여 정제된 ASFV p104 단백질의 아프리카 돼지 열병 진단의 유효성을 비교 평가하여 선택적이며 선별적인 진단적 유효성을 확인 함
- 상업용 대량 생산을 위해 재조합 세균 세포주를 6개 선별하여 그중 생산 효율성이 높은 재조합 세포주를 선별함. 또한 정제 과정을 5차례 다양하게 시도하여 48시간 이내 고순도의 재조합 단백질 정제 과정을 확립함.
- 반복적인 재조합 ASFV p104 항원 단백질 생산, 정제 및 저장 스크린에서 다소 불안정한 재조합 단백질의 성질을 관측함. 상업적 활용을 위해서는 생산된 재조합 항원의 장기간 저장 및 일관된 공정결과가 반드시 해야되어야 함. 저장 버퍼 조성을 20가지 pH, 염농도, 및 글라이세롤 함량 등을 스크린하여 -70도 조건에서 90일 이상 저장 가능한 조건으로 최적화함.



그림 18 재조합 ASFV p104 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

- 생산공정과 정제된 단백질의 저장 및 보관 조건을 스크린 하고 상업적으로 활용할 수 있는

수준으로 재조합 ASFV p104 항원 단백질의 생산, 정제 및 저장 조건 (pH7.0, 5% glycerol, 1 mM EDTA)을 확립함

- 2020년 6월 지적 재산권 확보를 위한 특허 출원을 완료(출원번호: 10-2020-0069300)하고 심사를 거쳐 2022년 8월 1일 특허등록결정서 통보를 받았음

마. ASFV p205 항원 생산 및 유효성 평가

- ASFV pE402R유전자가 발현한 ASFV p205 단백질은 바이러스의 외막 구성 단백질로 면역원성 항원으로 진단 및 백신 연구개발에서 매우 중요함
- 총 205개의 아미노산으로 구성된 이탈리아 유래 ASFV p205 단백질을 유사구조예측을 통해 항원성 주요 부위를 예측하고 120개에서 200개의 아미노산으로 구성된 10개의 재조합 ASFV p205 항원 절편의 대장균 세포주에서 발현을 스크린 함. 10개의 시도에서 전장 재조합 형태를 포함함 총 3개의 재조합 ASFV p205 항원 절편이 생산되었고 정제됨.
- 재조합 대장균 세포 1리터를 배양하여 48시간의 정제과정을 통해 약 5 mg의 ASFV p205 단백질 절편이 순수하게 분리 정제 됨.
- 상업용 ID Screen ASFV indirect ELISA kit를 이용하여 정제된 ASFV p205 단백질의 아프리카 돼지 열병 진단의 유효성을 비교 평가하여 205개의 아미노산으로 구성된 전장단백질과 120개의 아미노산으로 제작된 재조합 ASFV p205 항원 절편이 유사한 진단적 유효성을 분석함.
- 상업화와 단크론 항체 제작을 위한 20 mg이상의 재조합 바이러스 항원 단백질의 생산을 위해 재조합 ASFV p205 항원 절편을 생산하는 재조합 대장균 세포주 10개를 스크린하여



그림 20 재조합 ASFV p205 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

최상의 발현율을 지닌 세포주를 저장 후 반복 해동과정을 실시하며 재조합 대장균 세포주를 선별함. 염이온교환 크로마토 그래피 및 금속흡착크로마토그래피 등을 정제과정에 포함하여 정제된 재조합 항원의 순도를 높임. 항원의 활용을 위한 저장 조건을 온도, 시간, pH, 염농도 등을 다양하게 하여 스크린하고 선별하여 상업용 활용 가능한 수준으로 재조합 ASFV p205 항원 절편 생산 단계를 확립함

- 2020년 6월 지적 재산권 확보를 위한 특허 출원을 완료(출원번호: 10-2020-0069302)하고 심사를 거쳐 2022년 8월 8일 특허등록결정서 통보를 받았음

바. ASFV p30 항원 생산 및 유효성 평가

- 본 연구개발과제의 계획단계에서 세계동물보건기구(OIE)의 ASF ELISA 검사법에 따르면 P72와 P30을 항원성 단백질로 사용하고 있음에 재조합 ASFV p30 항원 절편을 생산이 필요함을 깨달음. 이에 ASFV 서열을 비교분석하여 케냐 유래의 P30 단백질 아미노산 서열에 ASFV 들간 서열 변이 부위에 해당하는 15개의 아미노산을 제거하고 "SASSES"의 유사보전 서열로 대체된 190-200 여개의 아미노산으로 구성된 재조합 ASFV p30 항원 절편을 디자인하고 재조합 형태로 대장균 세포에서 발현을 시도함
- 8개의 발현 construct들이 제작되어 40여개의 대장균 세포에서 단백질 항원 생산을 스크

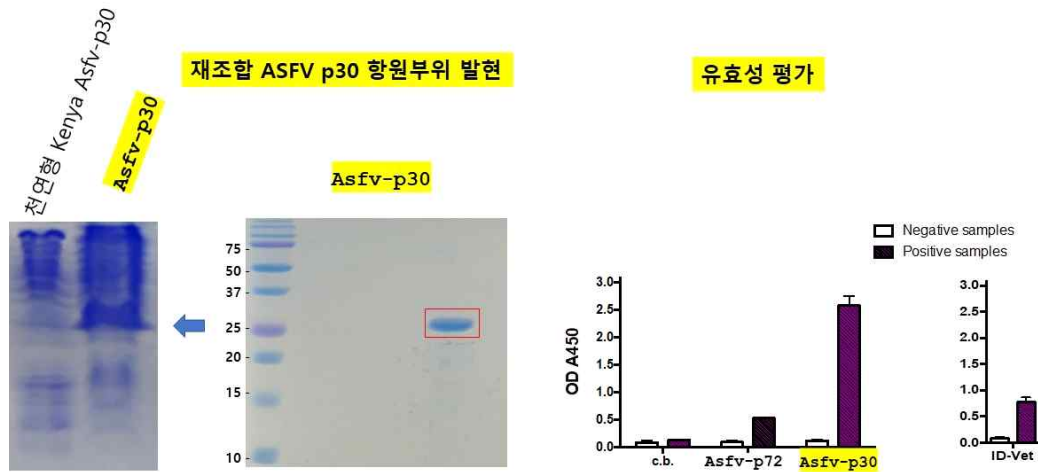


그림 21 재조합 ASFV p30 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

린하고 단백질 생산율이 가장 좋은 재조합 ASFV p30 항원 생산 대장균 세포주를 선별함

- 천연형 전장의 재조합 ASFV p30 단백질은 대장균에서 발현되지 않았으나 190여의 아미노산으로 디자인된 재조합 ASFV p30 항원 절편은 대장균에서 발현되었고, 재조합 대장균 세포 1리터를 배양하여 48시간의 정제과정을 통해 약 3mg의 총수율로 ASFV p30 단백질 절편이 순수하게 분리 정제 됨.
- 정제된 재조합 ASFV p30 단백질 절편의 진단적 유용성은 ELISA 기법을 통해 분석함. 본 연구팀에서 독점적으로 확보한 ASFV-P72 항원과 비교하여 4배 이상의 양성 검체 민감도를 지님을 확인함. 또한 상업용 ID-Vet사의 진단 시약과 비교하였을 때 약 3배 이상의 양성검체 민감도를 분석함.
- 본 연구개발과제 실시결과 재조합 ASFV p30 단백질 절편의 재조합 대장균 발현, 정제 및 진단적 유용성 진보성을 인정받아 특허출원을 2022년 3월 21일 완료함

사. ASFV p62 항원 생산 및 유효성 평가

- 상업용 ID-Vet사의 ASF ELISA 검사법에서는 P72, P30 과 P62를 사용함. 본 연구개발과제의 계획단계에서 해당 항원의 국산화로 국내외 경쟁력에 대한 제고가 고려됨.
- 천연형 ASFV p62는 530여개 아미노산으로 구성되어 있으며 서열 비교분석결과 항원 변이 분위가 관찰됨. 대장균 발현을 위해 200여개 이하 아미노산으로 구성되고 항원 변이 분위는 유사성으로 높은 아미노산으로 치환하여 7개의 ASFV p62 절편을 디자인하고 대장균에서의 생산을 스크린함.
- 천연형 전장의 재조합 ASFV p62 단백질은 대장균에서 발현되지 않았으나 130여의 아미노산을 함유하고 3개의 항원 다변화 부위가 보존성이 높은 아미노산으로 치환된 재조합

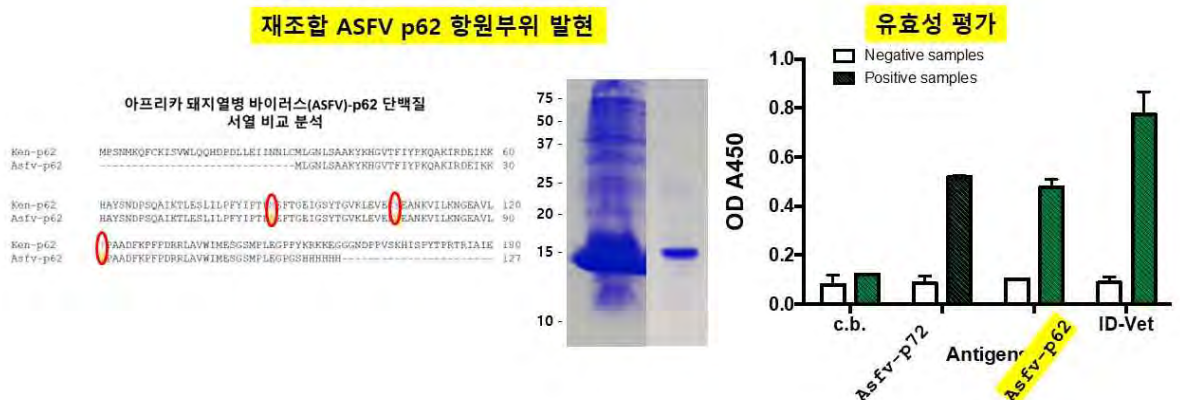


그림 22 재조합 ASFV p62 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

ASFV p62 항원 절편은 재조합 대장균 세포 1리터 배양한 후, 24시간의 정제과정을 통해

약 5mg의 총수율로 순수하게 재조합 ASFV p62 항원 절편을 획득할 수 있었음

- 대장균 세포주로부터 순수하게 분리 정제된 재조합 ASFV p62 단백질 절편의 진단적 유용성을 평가함. 재조합 ASFV p62 단백질 절편을 plate에 코팅한 후, ELISA 기법을 통해 분석함. 본 연구팀이 생산한 재조합 ASFV-P72 항원과 비교하여 유사한 양성 검체 민감도를 분석함. 그리고, 이미 상업용으로 개발된 ID-Vet사와 비교분석결과 유사한 양성검체 민감도를 평가함.
- 본 연구개발과제에서 계획한 재조합 ASFV p30 단백질 절편의 재조합 대장균 발현, 정제 및 진단적 유용성의 연구내용결과는 그 진보성을 인정받아 2022년 3월 30일 특허출원을 완료함

아. ASFV F20572 융합 항원 생산 및 유효성 평가

- ASF 감염증 진단의 선택적이고 특이적 민감도 확보를 위해 3개 이상의 바이러스 항원이 활용되고 있음. 상업화 단계에서 바이러스 항원 단백질의 생산과정 효율성과 진단키트 제작 과정의 정량적이고 정성적인 제조 공정률 제고를 위해서는 융합형태 재조합 항원의 생산이 본 연구개발단계에서 제시됨.
- ASFV 유래 항원 단백질들 중, 국내 독점적인 p72 항원과 p205 항원이 융합된 재조합 단백질 절편을 디자인하고 재조합 발현 constructs를 다양하게 디자인하여 총 20여개를 대장균 세포에서 발현을 시도함.
- ASFV p72 항원 단백질은 총 약 650여개의 아미노산으로 구성됨. ASFV p205 항원 단백질은 총 약 200여 개의 아미노산으로 구성됨. 융합 항원으로 재조합 발현 constructs을 디자인할 때, 각 항원들 사이에는 5개의 아미노산으로 구성된 GAGGS의 연결서열을 삽입하여 항원들의 공간 구조상 출동을 방지하여 융합항원 단백질의 안정성을 부여함. 단백질 생산 후 친화성 크로마토그래피를 이용한 정제를 위한 메탈이온 친화성 부위에 해당하는 8개의 GSHHHHHH서열을 삽입함. 재조합 융합 항원 단백질은 300여개 이하의 아미노산으로 구성되고 대장균 세포 발현을 고려함. 재조합 발현 constructs에서 ASFV p72와 ASFV p205 항원 절편을 p72-p204 또는 p205-p72로 다양하게 디자인함.
- 융합 항원으로 재조합 발현 constructs를 재조합 대장균에서 발현을 시도한 결과 p72-p204 순서로 디자인 된 ASFV F22205 융합 항원 단백질은 발현되지 않음. p205-p72 순서로, 총 200여개의 아미노산으로 구성된 ASFV F20572 융합 항원 단백질은 1리터의 대장균 세포 배양 후, 총 수율 1 mg 정도 순수하게 획득 됨. 수율이 다른 단백질 항원에 비해 다소 적으로 공정과정의 단순화 및 항원들 간의 실험적 오차를 극복할 수 있다는 탁월한 장점을 지님.
- 재조합 ASFV F20572 융합 항원 단백질의 아프리카돼지열병 감염의 진단적 유용성을 단일 항원들과 비교 분석함. ASFV p72 및 ASFV p205와 비교하였을 때 ASFV F20572은 우월한

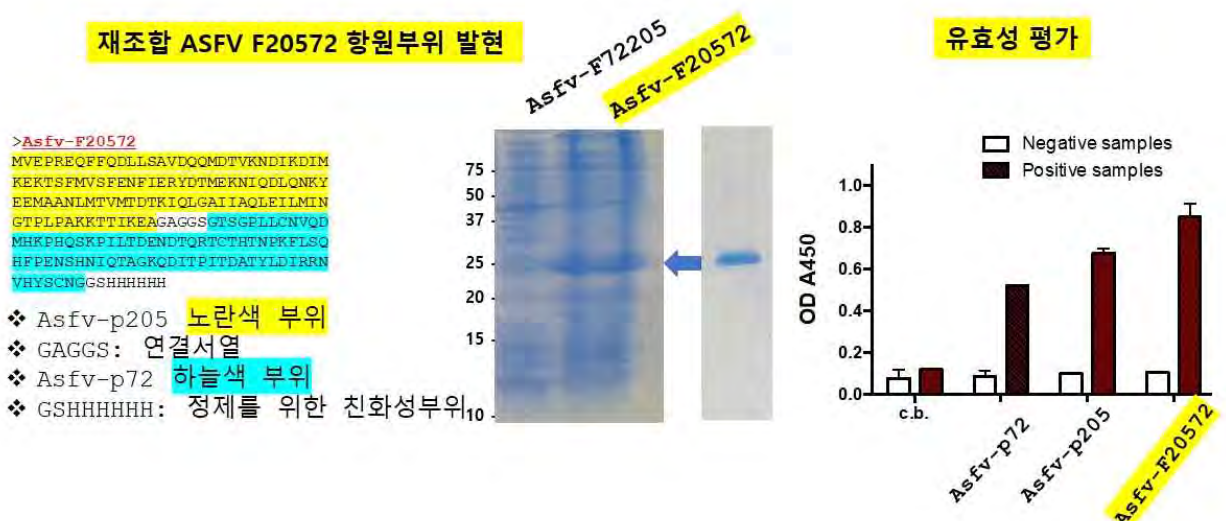


그림 23 재조합 ASFV F20472 융합 항원 단백질 절편의 생산과 유효성 평가

양성 검체에 대한 반응성을 지님. 또한 재조합 ASFV F20572 용합 항원을 상업용 ID-Vet사와 진단적 유용성의 비교분석결과 유사하거나 다소 월등한 양성검체 민감도를 관찰함.

- 본 연구개발과제 진행 단계에서 상업화 과정의 에로 사항을 접수하고 이를 극복하기 위해 디자인한 재조합 ASFV F20572 용합 항원 단백질의 재조합 대장균 발현, 정제 및 진단적 유용성의 연구결과에 대한 진보성으로 2022년 4월 25일 특허출원을 완료함.
- 현재 국내외 ASFV유래 용합 항원의 재조합 형태 발현의 보고는 본 연구팀이 유일하여 연구개발성과의 진보성과 독점적인 원천기술을 확보함

2-2. ASFV p205, p72 및 p104 재조합 항원 단백질 이용한 Indirect ELISA 개발 및 최적화

가. 각각의 재조합 항원의 Coating Plate 소재 선별

(1) Coating Plate 소재 선별

(가) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS)

(나) 시험방법:

① p205, p72, p104 재조합 항원을 고농도와 저농도로 코팅하여 Plate의 적합성을 분석함.

② Indirect ELISA Protocol은 Bio-Rad에서 제공하는 일반적인 SOP¹⁾를 따라 수행함.

(다) 실험결과: Plate의 소재에 따라 p72와 p205의 흡광도차이를 보이며, p104의 경우 4종류의 Plate에 모두 흡광도 결과값이 도출되지 않았음.

(라) 결과해석: p104는 진단항원으로 사용할 수 없음으로 판단됨. p72 및 p205의 경우 Maxi Plate와 Uni Plate에서 적합하나, 흡광도 값이 더 높은 Maxi Plate로 선정함.

	p205				p72				p104			
	2ug/ml		0.2ug/ml		2ug/ml		0.2ug/ml		2ug/ml		0.2ug/ml	
	PC	NC	PC	NC	PC	NC	PC	NC	PC	NC	PC	NC
Maxi	4.361	0.006	1.434	0.006	3.412	0.006	1.057	0.007	0.193	0.006	0.057	0.006
	4.288	0.007	1.412	0.006	3.337	0.005	1.016	0.006	0.201	0.006	0.053	0.006
Medi	0.541	0.006	0.152	0.006	0.310	0.006	0.123	0.006	0.058	0.007	0.011	0.006
	0.533	0.006	0.155	0.005	0.323	0.006	0.121	0.006	0.059	0.007	0.013	0.007
Uni	2.604	0.006	0.811	0.006	2.104	0.007	0.508	0.006	0.166	0.007	0.025	0.006
	2.592	0.007	0.807	0.006	2.098	0.006	0.513	0.006	0.164	0.006	0.024	0.007
Multi	0.611	0.006	0.201	0.006	0.417	0.007	0.144	0.006	0.076	0.007	0.017	0.006
	0.621	0.006	0.204	0.006	0.406	0.007	0.152	0.006	0.074	0.007	0.017	0.006

(2) 선별된 Plate의 비특이 반응 검증

(가) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS)

(나) 시험방법: 각각의 재조합 항원(p205, p72) 코팅유무에 따른 흡광도차이 분석함.

(다) 실험결과 및 결과해석: 재조합 항원이 코팅되지 않은 Plate에서 양,음성 표준물질의 흡광도 값이 도출되지 않았으므로 비특이적 반응이 발생되지 않음.

	p205		p72	
	2ug/ml	0ug/ml	2ug/ml	0ug/ml
NC	0.006	0.006	0.006	0.005

1) <https://www.bio-rad-antibodies.com/indirect-elisa-protocol.html>

NC	0.006	0.007	0.006	0.006
PC	4.319	0.007	3.445	0.006
PC	4.168	0.006	3.485	0.006

나. 재조합 항원 최적 농도 선정 및 임상검체의 비특이반응 검증

(1) 재조합 항원 농도 선정

(가) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 No.1~4 (충북동물위생시험소제공)

(나) 시험방법: 재조합 항원의 농도에 따른 시험대상의 흡광값을 분석함.

(다) 실험결과: 양성표준물질의 흡광도값은 코팅농도에 따라 감소하나, 음성 돼지 혈청은 모든 농도에서 높은 흡광도 값이 도출됨.

(라) 결과해석①: 재조합 항원의 농도와 상관없이 음성 돼지혈청에서 비특이 반응이 관찰되어 Uni Plate 변경하여 비특이반응 유무를 관찰함.

Maxi	p205 농도 (ug/ml)						p72 농도 (ug/ml)					
	4	2	1	0.5	0.25	0	4	2	1	0.5	0.25	0
NC	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.006	0.007	0.006	0.007	0.007	0.006	0.006
NC	0.006	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.008	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006
PC	5.422	4.328	3.604	2.813	1.686	0.006	4.898	3.445	2.298	1.689	1.121	0.006
PC	5.118	4.219	3.562	2.833	1.597	0.006	4.921	3.485	2.314	1.676	1.210	0.006
1	3.599	3.494	3.089	3.214	3.163	3.101	3.215	3.614	3.285	3.559	3.614	3.423
2	3.623	3.665	3.749	3.787	3.312	3.637	3.355	3.457	3.693	3.744	3.558	3.390
3	3.124	3.484	3.353	3.343	3.425	3.447	3.020	3.242	3.302	3.435	3.206	3.194
4	3.526	3.289	3.414	3.279	3.267	3.521	3.443	3.101	3.574	3.335	3.555	3.127

(마) 결과해석②: 재조합 항원의 농도에 따라 음성 돼지혈청에서 비특이 반응이 감소됨을 확인.

S/P(%)**값이 가장 낮은 구간이 적정 코팅 농도로 선정됨에 따라 p205의 경우 1~2ug/ml, p72의 경우 0.25ug/ml보다 낮은 농도가 적합함.

Uni	p205 농도 (ug/ml)						p72 농도 (ug/ml)					
	4	2	1	0.5	0.25	0	4	2	1	0.5	0.25	0
NC	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.007	0.006	0.007	0.007	0.006	0.006
NC	0.006	0.006	0.005	0.004	0.005	0.006	0.008	0.006	0.006	0.007	0.007	0.005
PC	3.722	2.658	1.821	1.342	0.887	0.006	3.296	2.117	1.318	0.878	0.61	0.006
PC	3.618	2.666	1.814	1.321	0.902	0.006	3.304	2.097	1.331	0.881	0.605	0.006
1	1.625	0.874	0.598	0.502	0.401	0.011	4.312	2.846	1.123	0.545	0.301	0.011
2	1.603	0.842	0.584	0.499	0.399	0.012	4.368	2.884	1.246	0.565	0.287	0.012
3	1.639	0.758	0.521	0.524	0.387	0.011	4.812	2.749	1.154	0.574	0.299	0.011
4	1.598	0.799	0.552	0.497	0.396	0.013	4.198	2.912	1.164	0.594	0.291	0.013

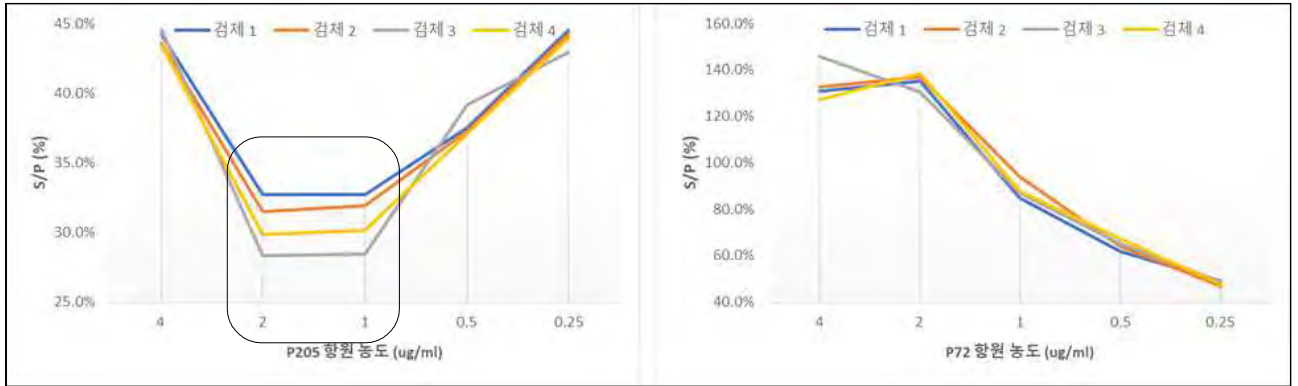


그림 24 재조합 항원 농도에 따른 S/P(%) 변화

$$**S/P(\%) = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{nc}}) / (OD_{\text{pc}} - OD_{\text{nc}}) \times 100$$

(2) p72 재조합 항원의 농도 최적화

(가) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 No.1~4 (충북동물위생시험소제공)

(나) 시험방법: p72 재조합 항원 0.2ug/ml ~ 0.01ug/ml 농도에 따른 시험대상의 흡광값 분석.

(다) 실험결과: 농도에 따른 흡광도값이 감소하며, 양성표준물질과 흡광도값의 차이는 크지 않으나, 음성돼지 혈청의 흡광도값과 확연히 구분가능함.

(라) 결과해석: S/P(%)가 가장 낮은 0.05ug/ml 농도를 p72 항원 농도로 선정

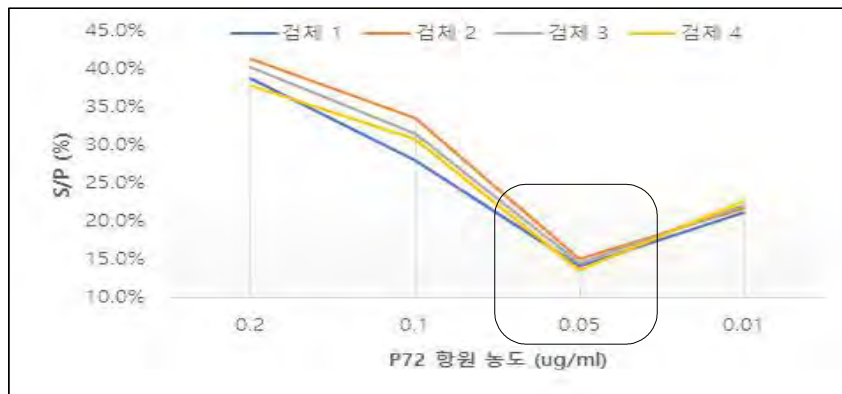


그림 25 p72 재조합 항원 농도에 따른 S/P(%) 변화

Uni	p72 농도 (ug/ml)				
	0.2	0.1	0.05	0.01	0
NC	0.007	0.006	0.007	0.007	0.005
NC	0.008	0.006	0.006	0.007	0.006
PC	0.51	0.439	0.371	0.21	0.007
PC	0.502	0.434	0.366	0.201	0.006
1	0.201	0.127	0.058	0.049	0.010
2	0.214	0.151	0.061	0.05	0.012
3	0.208	0.142	0.059	0.051	0.011
4	0.196	0.139	0.056	0.052	0.012

(3) 2종류의 항원(p205, p72) 조합 비율 및 최종 농도 선정

(가) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 No.1~4 (충북동물위생시험소제공)

(나) 시험방법: 선정된 각 항원의 농도에 따라 2종류의 항원을 혼합하여 Coating Plate를 제작하여 시험대상의 흡광도값과 S/P(%) 값을 분석함.

(다) 실험결과 및 결과해석: 음성 돼지혈청과 양성표준물질의 흡광도 차이로 인해 구분이 가능하며 음성 돼지혈청의 S/P(%) 값이 더 낮은 조합의 농도로 선정함.

No.	p205 (2ug/ml) + p72 (0.05ug/ml)			p205 (1ug/ml) + p72 (0.05ug/ml)		
	흡광도	S/P (%)	결과	흡광도	S/P (%)	결과
NC	0.006	-	-	0.006	-	-
NC	0.006	-	-	0.006	-	-
PC	2.858	-	-	1.921	-	-
PC	2.866	-	-	1.914	-	-
1	1.074	37.4%	음성	0.598	31.0%	음성
2	1.042	36.3%	음성	0.634	32.9%	음성
3	0.958	33.3%	음성	0.521	26.9%	음성
4	0.999	34.8%	음성	0.552	28.6%	음성

(4) 임상검체의 희석 배율 선정

(가) 시험목적: 항원의 농도 선별과정을 통해 음성 돼지혈청의 비특이반응 최소화하는 한계로 인해 임상검체의 희석 배율 조절 통해 비특이의 반응을 최대한 감소하기 위함.

(나) 시험대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 No.1~20 (충북동물위생시험소제공)

(나) 시험방법: 확보된 20마리의 음성 돼지혈청을 음성 표준물질을 이용하여 1/2, 1/10, 1/20, 1/40희석 후 검사를 진행 후 결과값을 비교함.

(다) 판정기준: 타사제품의 판정기준과 동일함.

구분	양성	음성
S/P(%)**	40이상	40미만

$$**S/P(%) = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{NC}}) / (OD_{\text{PC}} - OD_{\text{NC}}) \times 100$$

(라) 실험결과 및 결과해석: 1/40 희석시 모두 S/P(%) 40 미만으로 음성 판정. (그림 3.)

No.	1/2 희석			1/10 희석			1/20 희석			1/40 희석		
	흡광도	S/P(%)	결과	흡광도	S/P(%)	결과	흡광도	S/P(%)	결과	흡광도	S/P(%)	결과
NC	0.006	-	-	0.005	-	-	0.006	-	-	0.006	-	-
NC	0.006	-	-	0.006	-	-	0.006	-	-	0.005	-	-
PC	4.159	-	-	3.259	-	-	1.931	-	-	1.059	-	-
PC	4.246	-	-	3.246	-	-	1.944	-	-	1.046	-	-
1	1.815	43.11%	양성	1.257	38.53%	음성	0.605	31.01%	음성	0.238	22.2%	음성
2	1.95	46.32%	양성	1.354	41.52%	양성	0.65	33.34%	음성	0.263	24.6%	음성
3	1.365	32.38%	음성	0.943	28.86%	음성	0.455	23.25%	음성	0.185	17.1%	음성
4	1.725	40.96%	양성	1.195	36.62%	음성	0.575	29.46%	음성	0.233	21.7%	음성

5	2.205	52.40%	양성	1.527	46.85%	양성	0.735	37.74%	음성	0.291	27.2%	음성
6	2.025	48.11%	양성	1.412	43.31%	양성	0.675	34.64%	음성	0.273	25.5%	음성
7	2.13	50.61%	양성	1.476	45.28%	양성	0.71	36.45%	음성	0.281	26.3%	음성
8	1.725	40.96%	양성	1.195	36.62%	음성	0.575	29.46%	음성	0.232	21.6%	음성
9	2.25	53.47%	양성	1.569	48.14%	양성	0.75	38.52%	음성	0.302	28.3%	음성
10	1.5	35.60%	음성	1.044	31.97%	음성	0.5	25.58%	음성	0.204	18.9%	음성
11	2.355	55.98%	양성	1.636	50.21%	양성	0.785	40.33%	양성	0.311	29.1%	음성
12	2.43	57.76%	양성	1.682	51.62%	양성	0.81	41.63%	양성	0.321	30.1%	음성
13	2.2425	53.29%	양성	1.551	47.59%	양성	0.7475	38.39%	음성	0.297	27.8%	음성
14	2.4675	58.66%	양성	1.717	52.70%	양성	0.8225	42.27%	양성	0.327	30.7%	음성
15	2.16	51.33%	양성	1.499	45.99%	양성	0.72	36.97%	음성	0.29	27.1%	음성
16	2.2725	54.01%	양성	1.571	48.21%	양성	0.7575	38.91%	음성	0.302	28.3%	음성
17	3.045	72.42%	양성	2.113	64.90%	양성	1.015	52.24%	양성	0.404	38.0%	음성
18	2.16	51.33%	양성	1.495	45.86%	양성	0.72	36.97%	음성	0.29	27.1%	음성
19	2.64	62.77%	양성	1.831	56.21%	양성	0.88	45.25%	양성	0.353	33.2%	음성
20	2.535	60.26%	양성	1.754	53.84%	양성	0.845	43.44%	양성	0.337	31.6%	음성

다. 개발제품의 성능평가

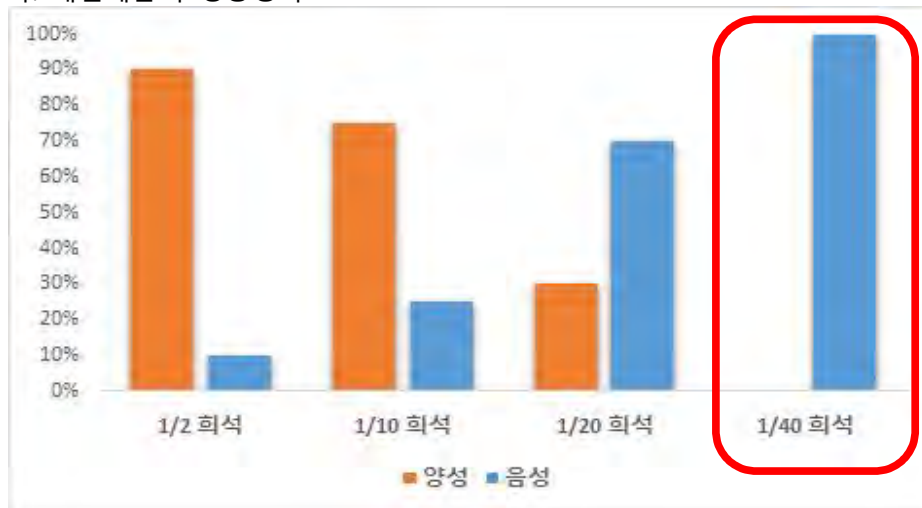


그림 26 시료 희석에 의한 매트릭스 효과

(1) 민감도

(가) 검사대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF)

(나) 검사방법: ASFV 양성 표준물질의 단계별 희석을 통해 최소 검출 한계치를 확인 후 타사 제품과 비교

(다) 판정기준

① 개발제품:

구분	양성	음성
S/P(%)**	40이상	40미만

**S/P(%) = (OD_{sample} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC}) X 100

② 타사제품: ID Screen African Swine Fever Indirect Screening (ID.vet)

구분	양성	음성	의심
S/P(%)**	40이상	40미만	31~39

$$**S/P(%) = (OD_{sample} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC}) \times 100$$

(라) 검사결과

- ① 개발제품: 1:200 희석배율까지 양성 판정 가능
- ② 타사제품: 1:100 희석배율까지 양성 판정 가능

(마) 결과해석: 개발된 제품의 민감도는 타사 제품의 민감도보다 2배 높은 것으로 확인됨.

	개발제품		타사제품	
	3반복 평균 흡광도	S/P (%)	3반복 평균 흡광도	S/P (%)
NC	0.008	-	0.010	-
PC	1.741	-	1.089	-
Pure	4.468	257.4%	1.186	109.0%
1:5	3.124	179.8%	1.047	96.1%
1:10	2.544	146.3%	0.934	85.6%
1:50	1.637	94.0%	0.625	57.0%
1:100	1.121	64.2%	0.489	44.4%
1:200	0.751	42.8%	0.376	33.9%
1:400	0.448	25.4%	0.308	27.6%

(2) 특이도

(가) 검사대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 80두 (충북동물위생시험소제공)

(나) 검사방법: 80두 음성 돼지 혈청 대상으로 개발 및 타사 제품 검사 결과와 일치율 확인.

(다) 판정기준:

① 개발제품:

구분	양성	음성
S/P(%)**	40이상	40미만

$$**S/P(%) = (OD_{sample} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC}) \times 100$$

② 타사제품: ID Screen African Swine Fever Indirect Screening (ID.vet)

구분	양성	음성	의심
S/P(%)**	40이상	40미만	31~39

$$**S/P(%) = (OD_{sample} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC}) \times 100$$

(라) 검사결과: 모두 S/P(%) 40 미만으로 음성

구분	개발 제품		
	양성 (n)	음성 (n)	특이도 (%)
음성 (n=80)	0	80	100

[Raw Data]

No.	개발제품			타사제품		
	흡광도	S/P(%)	결과	흡광도	S/P(%)	결과
NC	0.006	-	-	0.007	-	-
NC	0.006	-	-	0.007	-	-

PC	1.784	-	-	0.963	-	-
PC	1.734	-	-	0.960	-	-
1	0.242	13.5%	음성	0.049	4.4%	음성
2	0.260	14.5%	음성	0.052	4.7%	음성
3	0.182	10.0%	음성	0.013	0.6%	음성
4	0.230	12.8%	음성	0.037	3.1%	음성
5	0.294	16.4%	음성	0.054	4.9%	음성
6	0.270	15.1%	음성	0.051	4.6%	음성
7	0.284	15.9%	음성	0.059	5.4%	음성
8	0.202	11.2%	음성	0.016	0.9%	음성
9	0.300	16.8%	음성	0.068	6.4%	음성
10	0.200	11.1%	음성	0.018	1.2%	음성
11	0.314	17.6%	음성	0.069	6.5%	음성
12	0.324	18.1%	음성	0.072	6.8%	음성
13	0.299	16.7%	음성	0.068	6.4%	음성
14	0.329	18.4%	음성	0.066	6.2%	음성
15	0.288	16.1%	음성	0.059	5.4%	음성
16	0.303	16.9%	음성	0.064	6.0%	음성
17	0.406	22.8%	음성	0.121	11.9%	음성
18	0.288	16.1%	음성	0.05	4.5%	음성
19	0.332	18.6%	음성	0.071	6.7%	음성
20	0.338	18.9%	음성	0.081	7.8%	음성
21	0.264	14.7%	음성	0.064	6.0%	음성
22	0.280	15.6%	음성	0.066	6.2%	음성
23	0.235	13.1%	음성	0.034	2.8%	음성
24	0.217	12.1%	음성	0.023	1.7%	음성
25	0.294	16.4%	음성	0.066	6.2%	음성
26	0.254	14.2%	음성	0.045	4.0%	음성
27	0.302	16.9%	음성	0.074	7.0%	음성
28	0.311	17.4%	음성	0.077	7.3%	음성
29	0.446	25.1%	음성	0.139	13.8%	음성
30	0.285	15.9%	음성	0.066	6.2%	음성
31	0.274	15.3%	음성	0.051	4.6%	음성
32	0.211	11.7%	음성	0.02	1.4%	음성
33	0.231	12.8%	음성	0.045	4.0%	음성
34	0.220	12.2%	음성	0.04	3.5%	음성
35	0.322	18.0%	음성	0.088	8.5%	음성
36	0.208	11.5%	음성	0.032	2.6%	음성
37	0.292	16.3%	음성	0.065	6.1%	음성
38	0.293	16.4%	음성	0.066	6.2%	음성
39	0.283	15.8%	음성	0.061	5.7%	음성
40	0.323	18.1%	음성	0.079	7.5%	음성
41	0.337	18.9%	음성	0.089	8.6%	음성
42	0.288	16.1%	음성	0.059	5.4%	음성
43	0.299	16.7%	음성	0.063	5.9%	음성
44	0.191	10.6%	음성	0.012	0.5%	음성
45	0.239	13.3%	음성	0.036	3.0%	음성
46	0.210	11.7%	음성	0.031	2.5%	음성
47	0.270	15.1%	음성	0.048	4.3%	음성
48	0.258	14.4%	음성	0.04	3.5%	음성
49	0.218	12.1%	음성	0.03	2.4%	음성
50	0.484	27.3%	음성	0.174	17.5%	음성
51	0.329	18.4%	음성	0.088	8.5%	음성

52	0.174	9.6%	음성	0.01	0.3%	음성
53	0.291	16.3%	음성	0.063	5.9%	음성
54	0.273	15.2%	음성	0.055	5.0%	음성
55	0.219	12.1%	음성	0.02	1.4%	음성
56	0.229	12.7%	음성	0.029	2.3%	음성
57	0.221	12.3%	음성	0.023	1.7%	음성
58	0.257	14.3%	음성	0.047	4.2%	음성
59	0.238	13.2%	음성	0.039	3.4%	음성
60	0.234	13.0%	음성	0.038	3.2%	음성
61	0.245	13.6%	음성	0.044	3.9%	음성
62	0.203	11.2%	음성	0.011	0.4%	음성
63	0.283	15.8%	음성	0.066	6.2%	음성
64	0.200	11.1%	음성	0.018	1.2%	음성
65	0.290	16.2%	음성	0.072	6.8%	음성
66	0.296	16.5%	음성	0.081	7.8%	음성
67	0.279	15.6%	음성	0.069	6.5%	음성
68	0.261	14.6%	음성	0.049	4.4%	음성
69	0.258	14.4%	음성	0.041	3.6%	음성
70	0.285	15.9%	음성	0.063	5.9%	음성
71	0.183	10.1%	음성	0.012	0.5%	음성
72	0.234	13.0%	음성	0.027	2.1%	음성
73	0.233	12.9%	음성	0.03	2.4%	음성
74	0.198	10.9%	음성	0.011	0.4%	음성
75	0.186	10.2%	음성	0.012	0.5%	음성
76	0.244	13.6%	음성	0.041	3.6%	음성
77	0.199	11.0%	음성	0.013	0.6%	음성
78	0.222	12.3%	음성	0.019	1.3%	음성
79	0.261	14.5%	음성	0.052	4.7%	음성
80	0.223	12.4%	음성	0.031	2.5%	음성

(3) 재현성 및 반복성

(가) 검사대상: ASFV 양성 표준물질(ID.vet, MRI-ASF), 음성 표준물질(1X PBS) 및 ASFV 음성 돼지 혈청 20두 (충북동물위생시험소제공)
ASFV 양성 돼지 혈청 10두 (러시아 연방수의연구소제공)

(나) 검사방법: 음성 20마리(No.1~20), 양성 10마리(No.21~30) 임상검체 대상으로 1일 1회 2반복 검사를 5일 동안 수행한 흡광도 값의 편차 확인.

(다) 판정기준:

구분	양성	음성
S/P%**	40이상	40미만

$$**S/P(\%) = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{NC}}) / (OD_{\text{PC}} - OD_{\text{NC}}) \times 100$$

(라) 검사결과 및 결과해석: 양성검체 흡광도(OD)의 표준편차(SD)는 ~0.089, 음성검체 흡광도의 표준편차는 ~0.016이며, 변동계수(CV%)는 모두 ~5% 이하로 재현성 평가결과 적합한 것으로 확인함.

No.	1일	2일	3일	4일	5일	AVG	SD	CV(%)	S/P(%)	결과
NC	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000	-	-	-
PC	1.765	1.754	1.721	1.752	1.766	1.752	0.021	1.2%	-	-
1	0.242	0.254	0.238	0.248	0.252	0.247	0.007	2.7%	13.8%	음성
2	0.260	0.275	0.275	0.256	0.266	0.267	0.009	3.3%	15.0%	음성
3	0.182	0.188	0.179	0.173	0.173	0.179	0.006	3.4%	9.9%	음성

4	0.230	0.233	0.237	0.228	0.222	0.230	0.005	2.4%	12.9%	음성
5	0.294	0.303	0.299	0.291	0.295	0.296	0.005	1.6%	16.7%	음성
6	0.270	0.262	0.266	0.271	0.285	0.271	0.009	3.2%	15.2%	음성
7	0.284	0.268	0.291	0.292	0.295	0.286	0.011	3.8%	16.1%	음성
8	0.202	0.201	0.192	0.194	0.203	0.198	0.005	2.5%	11.1%	음성
9	0.300	0.294	0.306	0.307	0.298	0.301	0.005	1.8%	16.9%	음성
10	0.200	0.204	0.195	0.210	0.201	0.202	0.006	2.8%	11.3%	음성
11	0.314	0.299	0.296	0.327	0.298	0.307	0.013	4.4%	17.3%	음성
12	0.324	0.318	0.327	0.320	0.343	0.326	0.010	3.0%	18.4%	음성
13	0.299	0.303	0.292	0.286	0.286	0.293	0.008	2.6%	16.5%	음성
14	0.329	0.341	0.340	0.325	0.332	0.333	0.007	2.1%	18.8%	음성
15	0.288	0.282	0.287	0.301	0.279	0.288	0.009	3.0%	16.2%	음성
16	0.303	0.291	0.305	0.285	0.309	0.298	0.010	3.4%	16.8%	음성
17	0.406	0.396	0.390	0.396	0.430	0.403	0.016	3.9%	22.8%	음성
18	0.288	0.272	0.284	0.282	0.288	0.283	0.007	2.4%	15.9%	음성
19	0.352	0.359	0.348	0.354	0.353	0.353	0.004	1.1%	19.9%	음성
20	0.338	0.333	0.347	0.338	0.348	0.341	0.007	1.9%	19.2%	음성
21	2.612	2.480	2.541	2.681	2.684	2.599	0.089	3.8%	148.8%	양성
22	1.795	1.801	1.695	1.826	1.869	1.797	0.064	3.6%	102.8%	양성
23	2.030	1.997	2.114	2.067	2.027	2.047	0.045	2.2%	117.1%	양성
24	2.102	2.068	2.051	2.041	2.158	2.084	0.048	2.3%	119.2%	양성
25	1.440	1.481	1.450	1.423	1.478	1.454	0.025	1.7%	83.1%	양성
26	1.654	1.636	1.561	1.672	1.574	1.619	0.049	3.0%	92.6%	양성
27	1.311	1.339	1.266	1.255	1.264	1.287	0.036	2.8%	73.5%	양성
28	1.598	1.666	1.519	1.670	1.608	1.612	0.062	3.8%	92.1%	양성
29	1.742	1.764	1.826	1.709	1.722	1.753	0.046	2.6%	100.2%	양성
30	1.712	1.711	1.712	1.814	1.710	1.732	0.046	2.7%	99.0%	양성

2. ASFV p205, p72 항원 단백질 이용한 Indirect ELISA 시제품

가. PI-ASF Ab ELISA Kit 구성품 및 매뉴얼 (그림4.)



그림 27 제품 시제품 및 매뉴얼

No.	명칭	규격	외관상 특징
1	ASFV antigen coated plate	5Plate	은박포장의 96well plate
2	20X Washing buffer	120mlx1	투명용기의 무색액상제제
3	Dilution buffer	120mlx1	투명용기의 무색액상제제
4	HRP Conjugate	70mlx1	투명용기의 무색액상제제
5	Substrate solution	70mlx1	갈색용기의 무색액상제제
6	Stop solution	70mlx1	투명용기의 무색액상제제

7	Positive control	1.6ml	투명용기의 무색액상제제
8	Negative control	1.6ml	투명용기의 무색액상제제
9	사용설명서	1부	-

나. PI-ASF Ab ELISA Kit 사용방법

(가) 사용 전 준비사항

- ① 제품 내 모든 시약은 상온에서 30분간 적응 후 사용하고, 20X Washing buffer는 증류수로 20배 희석하여 1X Washing buffer로 제조한다.
- ② Dilution buffer을 이용하여 검체를 1/40희석하여 준비한다.

(나) 사용방법

- ① 시험에 필요한 양만큼의 strip을 플레이트 프레임에 고정한다.
- ② 플레이트의 각 well에 준비된 혈장 100ul을 넣는다. 그리고 Positive Control (PC)와 Negative Control (NC)을 100μl씩 차례대로 넣는다. 혈장은 사용 전 vortex를 사용하여 충분히 균질하게 만든 후 사용한다.
- ③ 플레이트를 가볍게 쳐서 잘 혼합한 다음, Sealing film으로 플레이트를 sealing 후 37°C 배양기에서 30분간 반응한다.
- ④ 각 well의 내용물을 흡입해 내고 1X Washing buffer으로 5회 세척한다. (1회: 300ul/well)
- ⑤ HRP Conjugate을 각 well에 100ul씩 넣는다.
- ⑥ 플레이트를 가볍게 쳐서 잘 혼합한 다음, 새로운 Sealing film으로 플레이트를 sealing 후 37°C 배양기에서 30분간 반응한다.
- ⑦ 각 well의 내용물을 흡입해 내고 1X Washing buffer으로 5회 세척한다. (1회: 300ul/well)
- ⑧ Substrate solution을 각 well에 100ul씩 넣고 상온에서 15분간 반응한다. 이때 빛이 차단된 상태에서 반응한다.
- ⑨ Stop solution을 각 well에 100ul씩 넣어 반응을 정지시킨다.
- ⑩ 측정 파장 450nm, 참조 파장 620nm를 사용하여 5분 이내에 흡광도를 측정한다.

(다) 결과판정

구분	양성	음성
S/P(%)**	40이상	40미만

$$**S/P(\%) = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{NC}}) / (OD_{\text{PC}} - OD_{\text{NC}}) \times 100$$

(라) 정도관리: 양, 음성대조군의 흡광도값이 다음 기준 일 때 유효성 인정

- Positive control (PC) 흡광도(OD) 값 > 1.0
- Negative control (NC) 흡광도(OD) 값 < 0.1

3. ASFV p205, p72 및 p104 항체 제작

1. BALB/c mice 면역화

가. p205, p72 및 p104를 사용한 BALB/c mice 면역화 진행

나. 추가 부스트 진행

2. 면역 세포 융합 및 스크리닝

- 가. 면역 세포와 골수종 세포 퓨전 진행
- 나. 비특이적 항체 발현 세포를 스크리닝
- 다. 재조합 항원에 반응하는 10개의 단일 클론 배양
- 라. 10개의 단일 클론에 대한 에피토프 비닝 및 친화도 확인

- (1) p205 항원으로 면역화된 퓨전 세포의 특성 확인
 - (가) 실험대상: p205 항원으로 면역화된 퓨전 세포
 - (나) 실험방법: p205를 1 μ g/ml로 코팅하고 면역화된 퓨전 세포를 단계 희석하여 검사하였으며, 결과값으로 퓨전 세포의 친화도를 분석함.
 - (다) 실험결과: 10개의 퓨전 세포에 대한 친화도 차이 확인.
 - (라) 결과해석: 친화도가 높은 상위 5개의 퓨전 세포를 서브 클로닝 세포로 선정.(그림1.)

Dilution	1B4A3	2A2D2	2E4B5	2F1G9	3A3G5	3C6C11	4E8A7	8G5C12	10G12D9	13G1B10
no-dilution	2.895	2.800	2.812	2.791	2.629	2.727	2.495	2.112	2.580	2.886
1/3	3.266	3.247	3.184	2.844	2.930	3.071	2.609	2.533	2.903	3.124
1/9	3.068	3.149	3.140	2.894	2.467	2.807	2.590	2.419	3.309	3.328
1/27	3.245	3.104	3.092	2.955	2.203	3.021	2.650	2.827	2.790	2.986
1/81	3.214	2.918	2.689	2.445	1.405	2.456	2.199	2.136	2.414	2.634
1/243	2.736	2.173	1.838	1.642	0.667	1.572	1.613	1.619	1.784	2.242
1/729	1.885	1.192	0.944	0.800	0.299	0.752	0.878	0.899	0.780	1.024
1/2187	0.905	0.509	0.369	0.325	0.131	0.304	0.345	0.365	0.293	0.335
1/6561	0.346	0.208	0.155	0.143	0.083	0.139	0.154	0.168	0.149	0.164
1/19683	0.164	0.106	0.087	0.086	0.059	0.083	0.084	0.092	0.094	0.123
1/59049	0.087	0.065	0.061	0.063	0.050	0.057	0.058	0.070	0.080	0.074
0	0.052	0.049	0.049	0.052	0.046	0.051	0.050	0.055	0.062	0.058
Analogy EC50(ng/ml)	1.025	2.081	2.937	3.308	12.390	3.619	2.719	2.402	3.171	2.332
EC50(ng/ml)	1.656	2.228	2.322	3.378	3.182	2.289	5.416	2.118	3.532	3.340
R square	0.993	0.993	0.994	0.997	0.995	0.993	0.997	0.972	0.982	0.992

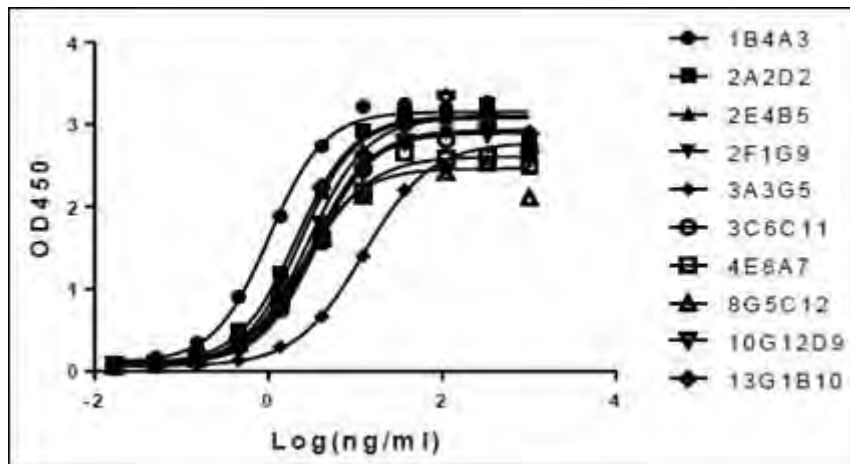


그림 28 p205 항원의 10개 단일 클론에 대한 EC50 확인 결과

Affinity ranking	Clone name	EC50 (ng/ml)	Epitope
1	1B4A3	1.656	Epitope 1
2	8G5C12	2.118	Epitope 3
3	2A2D2	2.228	Epitope 2
4	3C6C11	2.289	Epitope 2
5	2E4B5	2.322	Epitope 2
6	3A3G5	3.182	Undetermined

7	13G1B10	3.34	Epitope 2
8	2F1G9	3.378	Epitope 2
9	10G12D9	3.532	Epitope 4
10	4E8A7	5.416	Epitope 1

(2) p72 항원으로 면역화된 퓨전 세포의 특성 확인

(가) 실험대상: p72 항원으로 면역화된 퓨전 세포

(나) 실험방법: p72를 1 μ g/ml로 코팅하고 면역화된 퓨전 세포를 단계 희석하여 검사하였으며, 결과값으로 퓨전 세포의 친화도를 분석함.

(다) 실험결과: 10개의 퓨전 세포에 대한 친화도 차이 확인.

(라) 결과해석: 친화도가 높은 상위 5개의 퓨전 세포를 서브 클로닝 세포로 선정. (그림2.)

Dilution	3F9G7	6H8H5	8H12E11	9G1A1	12A6E5	12A12C4	13A6B11	14A9D7	14E11H3	14H12C5
no-dilution	2.706	2.565	2.646	2.694	2.688	2.713	3.223	3.204	3.174	3.297
1/3	2.978	2.975	2.931	2.761	2.885	3.063	3.328	3.342	3.178	3.39
1/9	3.104	3.102	2.969	2.903	2.877	2.914	2.95	3.066	3.028	3.176
1/27	2.8	2.876	2.346	2.813	2.67	2.382	3.071	2.94	2.966	2.922
1/81	2.157	2.48	1.693	2.411	2.114	1.617	2.463	2.304	2.653	2.46
1/243	1.621	2.48	1.086	2.308	1.649	0.944	1.562	1.334	2.01	1.628
1/729	0.678	1.5	0.466	1.438	0.809	0.399	0.72	0.578	1.134	0.84
1/2187	0.23	0.505	0.163	0.536	0.274	0.166	0.313	0.262	0.469	0.34
1/6561	0.113	0.222	0.095	0.255	0.132	0.108	0.136	0.122	0.203	0.152
1/19683	0.073	0.121	0.065	0.155	0.081	0.072	0.084	0.081	0.101	0.085
1/59049	0.063	0.083	0.064	0.088	0.066	0.066	0.07	0.088	0.072	0.063
0	0.057	0.054	0.052	0.059	0.063	0.063	0.061	0.061	0.051	0.052
Analogy EC50(ng/ml)	4.002	1.34	7.996	1.404	3.471	9.861	4.491	5.941	2.501	4.512
EC50(ng/ml)	1.341	1.341	2.92	1.278	2.212	2.463	1.862	2.811	1.738	3.92
R square	0.991	0.984	0.990	0.993	0.995	0.992	0.996	0.998	0.999	0.999

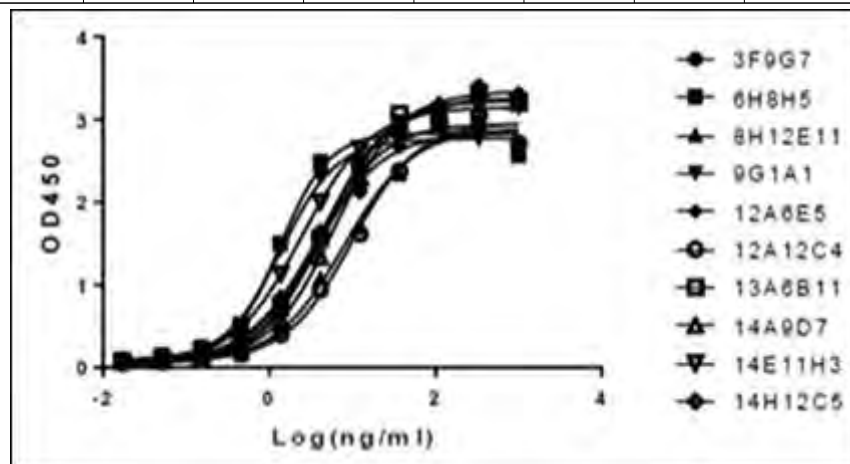


그림 29 p72 항원의 10개 단일 클론에 대한 EC50 확인 결과

Affinity ranking	Clone name	EC50 (ng/ml)	Epitope
1	9G1A1	1.278	Epitope 1
2	3F9G7	1.341	Epitope 1
3	6H8H5	1.341	Epitope 1
4	14E11H3	1.738	Epitope 1
5	13A6B11	1.862	Epitope 2

6	12A6E5	2.212	Epitope 2
7	12A12C4	2.463	Epitope 2
8	14A9D7	2.811	Epitope 2
9	8H12E11	2.92	Epitope 2
10	14H12C5	3.92	Epitope 2

(3) p104 항원으로 면역화된 퓨전 세포의 특성 확인

(가) 실험대상: p104 항원으로 면역화된 퓨전 세포

(나) 실험방법: p104를 1 μ g/ml로 코팅하고 면역화된 퓨전 세포를 단계 희석하여 검사하였으며, 결과값으로 퓨전 세포의 친화도를 분석함.

(다) 실험결과: 10개의 퓨전 세포에 대한 친화도 차이 확인.

(라) 결과해석: 친화도가 높은 상위 5개의 퓨전 세포를 서브 클로닝 세포로 선정. (그림3.)

Dilution	1A10D1	1C12C4	1H4E11	2G4B9	2H11F12	3F5G9	3G4E9	12H6B6	12H8E8	15D8B3
no-dilution	3.308	3.129	3.317	3.299	3.480	3.412	3.537	3.248	2.819	3.299
1/3	3.223	3.042	3.349	3.240	3.386	3.285	3.278	3.151	3.009	3.285
1/9	3.201	2.800	3.254	2.998	3.297	3.375	3.096	3.105	2.855	3.196
1/27	2.980	2.294	3.109	2.727	3.254	3.141	2.560	2.817	2.484	2.988
1/81	2.666	1.445	2.701	1.969	2.914	2.708	1.764	2.436	2.050	2.912
1/243	1.912	0.718	1.953	1.130	2.391	1.947	0.943	1.668	1.401	2.180
1/729	1.047	0.314	0.948	0.494	1.506	1.039	0.404	0.872	0.641	1.278
1/2187	0.494	0.138	0.399	0.200	0.764	0.445	0.171	0.390	0.315	0.591
1/6561	0.208	0.076	0.171	0.110	0.330	0.197	0.093	0.174	0.129	0.268
1/19683	0.105	0.059	0.093	0.071	0.147	0.106	0.066	0.103	0.074	0.127
1/59049	0.076	0.051	0.062	0.060	0.081	0.067	0.053	0.068	0.059	0.076
0	0.054	0.065	0.053	0.053	0.056	0.055	0.052	0.059	0.072	0.053
Analogy EC50(ng/ml)	3.033	14.980	3.217	8.457	1.794	3.207	12.960	4.017	5.132	2.156
EC50(ng/ml)	4.524	22.068	1.040	2.034	1.753	1.191	1.113	9.750	4.393	1.769
R square	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000	0.997	0.999

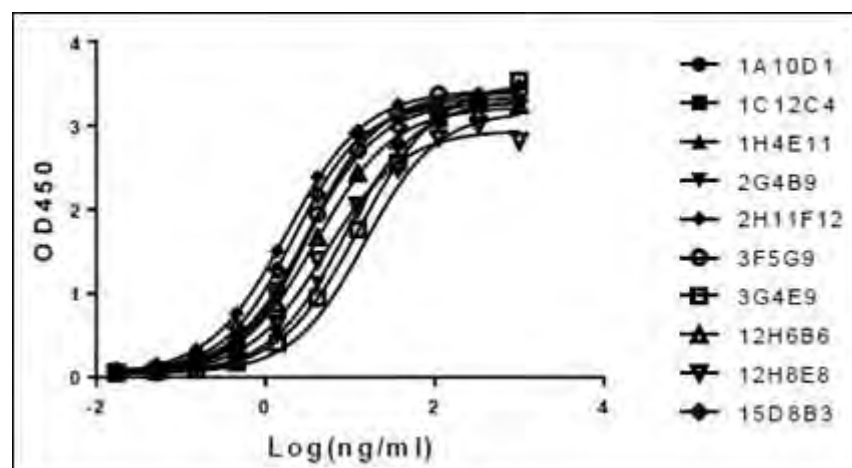


그림 30 p104 항원의 10개 단일 클론에 대한 EC50 확인 결과

Affinity ranking	Clone name	EC50 (ng/ml)	Epitope
1	1H4E11	1.04	Epitope 2
2	3G4E9	1.113	Epitope 2
3	3F5G9	1.191	Epitope 2

4	2H11F12	1.753	Epitope 3
5	15D8B3	1.769	Epitope 3
6	2G4B9	2.034	Epitope 2
7	12H8E8	4.393	Undetermined
8	1A10D1	4.524	Epitope 1
9	12H6B6	9.75	Undetermined
10	1C12C4	22.068	Epitope 1

2-3. ASFV 분자 진단 real-time PCR 개발

가. ASFV 진단위한 real-time PCR 체외 진단 시약 개발

- ASFV 유전체비교분석을 통해 진단을 위한 real-time qPCR용 primer 및 probe를 설계하고 cyber green형광을 이용한 정량 및 정성분석의 시약 개발함
- ASFV를 고감도로 검출하기 위하여 ASFV에 대한 real-time PCR을 개발
- ASFV를 민감하고 정확하게 검출할 수 있었을 뿐만 아니라 특이도가 높았음.



<그림 31 ASFV 진단을 위한 real-time qPCR 용 primer 및 probe 설계>

나. ASF 현장 진단용 장비 및 1회용 카트리지 개발

- ASFV 핵산추출시약, 증폭시약(프라이머/프로브/마스터믹스)가 일체화된 카트리지 개발하여 미숙련자도 쉽게 사용할 수 있도록 본 연구개발과제를 진행함
- PCR tube를 쉽게 조립하여 사용할 수 있도록 개발하여 ASF 모듈형 분자진단 오픈플랫폼으로 개발함
- real-time PCR을 통해 현장에서 즉시 검체를 처리하고 real-time PCR을 실시하여 병원체를 검출할 수 있는 시스템을 개발하고자 하였음



그림 32 POCT real-time PCR 장비 및 1회용 카트리지

- 미국에서 개발된 스마트 real-time PCR(바이오메메, Biomeme)은 현장에서 real-time PCR

을 실시할 수 있도록 최적화되어 있음

- 자동화 최적화: 현재 시제품 수준으로 개발한 분자진단 POCT를 상품화 가능한 수준으로 최적화 개발함. 장비의 크기를 현재보다 20% 이상 소형화/경량화 (현재 184x538x480mm, 20kg). 사용자가 카트리지를 쉽게 넣고 뺄 수 있도록 사용자 편의성을 개선함.
- 분자진단 POCT 극산화 성공하고 (Interface 모듈과 POCT 모듈을 분리하여 향후 복수의 POCT 기기를 연결하여 사용할 수 있도록 개발) 동물용 의료기 제조품목 허가 완료함 (2021년 9월 2일)
- 1회용 ASF 바이러스 진단용 카트리지를 개발 완료함
- PCR chamber 로 구성된 카트리지를 이용하여 선진국 경쟁사 제품보다 민감도와 특이도에 서 우수하며, 기술적으로 차별화함.
- 본 연구개발과제 진행으로 에이비아이(주)는 독창적인 구조의 카트리지를 개발하여, 분자 진단의 핵심인 민감도와 특이도를 진단 최소 단위 (LOD, limit of detection,)을 10 copies/ μ L으로 획기적 개선함.

2-4. ASF 진단키트 개발을 위한 국내 사육 및 야생 멧돼지 혈청 확보

가. 필요 및 목적

국내 사육 또는 야생 멧돼지에 대한 ASFV 감염 여부를 신속하게 진단하기 위한 진단 키트 개발과 관련하여 키트의 특이도 측정과 validation을 위해 ASFV 비감염 사육 돼지, 야생 멧돼지 로 부터 검증된 음성 혈청 패널 제공이 필수임

나. 재료 및 방법

○ 국내 도축장에 출하된 모돈을 대상으로 개체별 혈액(WBC)과 조직시료, 구강액, 혈청을 채취하여 ASFV에 대한 검사를 실시하였다. 채취량은 출하 농가별 10두 ~ 16두로 하였다.

○ 국내 돼지 농가에서 사육 중인 비육 돼지와 모돈을 대상으로 개체별 혈액(WBC)과 혈청을 채취하여 ASFV에 대한 검사를 실시하였다. 채취 두수는 농가별 10두(비육+모돈)로 하였다.

○ 국내 포획 야생멧돼지에서 개체별로 혈액(WBC), 혈청을 채취하여 ASFV에 대한 검사를 실시하였다. 지역별 포획된 개체에 대해 혈액(WBC), 혈청을 채취하였다.

○ 시료 채취 및 처리

- 혈액

도축장에서 안락사 과정을 거친 돼지의 경정맥을 통해 무균적으로 채취하였으며 농장 사육 돼지는 보정줄을 이용하여 경정맥 채혈하였다. 야생 멧돼지의 혈액은 환경부에서 ASF 방역을 위해 허가를 득한 멧돼지 전문 포획사들이 포획 직후 채혈하여 검사 기관에 송부한 것을 대상으로 하였다. 혈액은 EDTA 튜브(10ml, Becton Dickinson and company, USA)와 Blood clot activator tube(10ml, Becton Dickinson and company, USA)에 5ml씩 채취한 후 냉장 수송하여 실험실에서 처리하였다. 대용량 원심분리기(Labogene 1580R, Denmark)를 이용하여 혈청과 WBC를 분리(2,500rpm, 10분) 하였다. WBC와 혈청은 소분하여 -80°C 보관하였다.

- 구강액

전살된 돼지가 이동 트레이에 누워 있을 때 검자를 이용하여 돼지의 입술 안쪽과 혀 밑 쪽, 입천장을 일정 시간 멸균 거즈로 문질러 구강액이 거즈에 흡수되도록 한 후 별도로 제작한 구강액 회수용 15ml 튜브에 담아 냉장 수송하여 실험실에서 처리하였다. 대용량 원심분리기(Labogene 1580R, Denmark)로 거즈에 흡수되어 있는 구강액을 분리((2,500rpm, 10분)한 후 상층액 1ml를 회수하여 0.45 μ m pore size 필터(Millipore, USA)로 필터링하였다. 구강액을 소분하여 -80°C 에 보관하였다.

- 조직시료

도축장에서 도축검사 시 적출된 폐와 폐 림프 조직의 일부를 멸균된 1회용 가위로 20g 정도 채취하여 6 well plate에 담은 후 냉장 수송하여 실험실에서 처리하였다. 조직 20mg을

세라믹 비드가 들어있는 멸균된 PBS tube(IDEXX, USA)에 넣어 균질화 장비(Bertin, France)로 파쇄한 후 원심분리(13000rpm, 1분)하여 상층액 200 μ l를 핵산 추출에 사용하였다.

- 핵산추출: WBC, 구강액, 조직액 200 μ l에 대하여 자동화된 핵산추출장비(MagPurix viral Nucleic acid kit)를 이용하여 핵산 추출을 실시하였다.

- ASFV 음성 확인

ASFV에 대한 음성 검체임을 확인하기 위하여 항원(qPCR)과 항체(ELISA) 검사를 실시하였다. 개체별 WBC와 구강액, 조직에서 각각 핵산 추출 후 1건으로 pooling하여 시판 중인 ASFV qPCR 키트(Mediandiagnosics, Korea)의 template로 검사 사용하였다. 혈청과 구강액에서 ASFV 특이 항체 존재 여부를 확인하기 위해 시판 중인 ASFV Ab ELISA(ID Screen ASF Ab ELISA, France)와 구강액 ASFV Ab ELISA(ASF Oral fluid Ab ELISA kit, IDvet, France) 키트로 검사하였다.



그림 33 별도 제작한 구강액 회수용 15ml 튜브

다. 결과

(1) 국내

○ 채취 결과

- 사육돼지: 30호(중복 포함), 300두수에 대하여 WBC, 혈청, 구강액, 폐조직 각각 300건씩 채취

표 31. 사육 돼지에 대한 시료 채취 내역

시료 번호	지역	농가 수	두수	시료 수			
				WBC	혈청	구강액	폐 조직
	합계	30	300	300	300	300	300
1 - 50	청주	5	50	50	50	50	50
51 - 100	충주	5	50	50	50	50	50
101 - 150	음성	5	50	50	50	50	50
151 - 200	진천	5	50	50	50	50	50
201 - 250	괴산	5	50	50	50	50	50
251 - 300	제천·단양	5	50	50	50	50	50

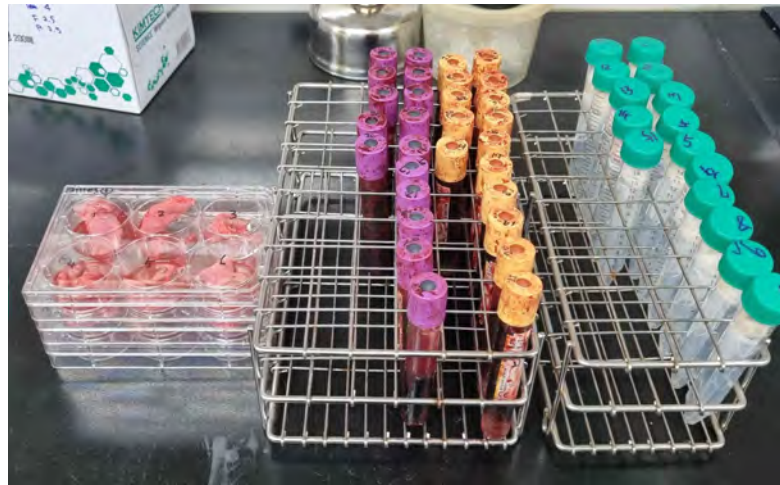


그림 34 사육 돼지에서 채취한 조직, WBC, 혈청, 구강액 시료

- 야생 멧돼지 : 500두에 대하여 WBC, 혈청을 채취였다.

표 28. 야생 멧돼지 시료 채취 내역

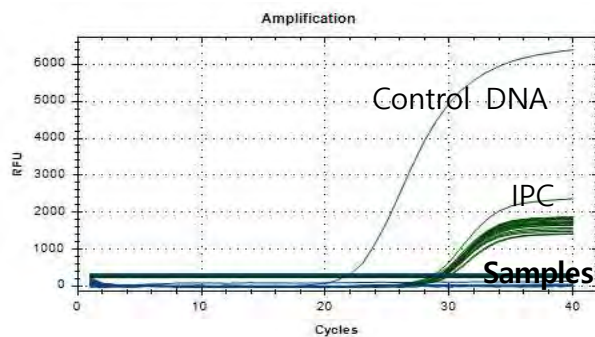
시료 번호	지역	두수	야생 멧돼지 시료 수			
			WBC	혈청	구강액	폐 조직
	합계	0	500	500	-	-
1 - 18	괴산	18	18	18	-	-
19 - 46	단양	28	28	28	-	-
47 - 84	보은	38	38	38	-	-
85 - 102	영동	18	18	18	-	-
103 - 126	옥천	24	24	24	-	-
127 - 146	음성	20	20	20	-	-
147 - 252	제천	106	106	106	-	-
253 - 298	진천	46	46	46	-	-
299 - 314	청주	16	16	16	-	-
315 - 500	충주	186	186	186	-	-

○ ASFV 음성 확인

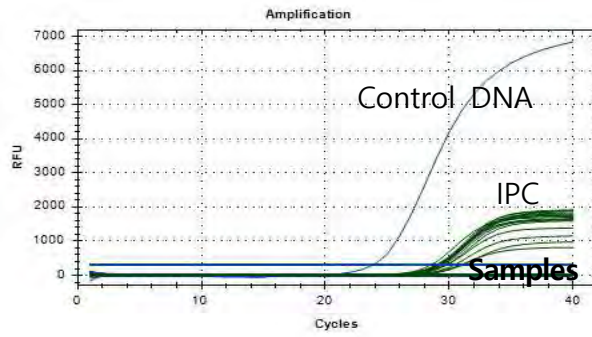
채취 시료에 대한 ASFV 항원, 항체 검사 결과 모든 시료에서 음성임을 확인하였다.

- 모든 시료 qPCR 결과(300건)

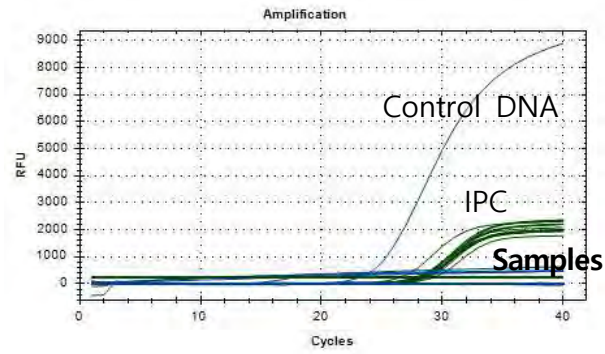
※ Blue line : Control DNA, Samples, NC, Green line: IPC(internal positive control)



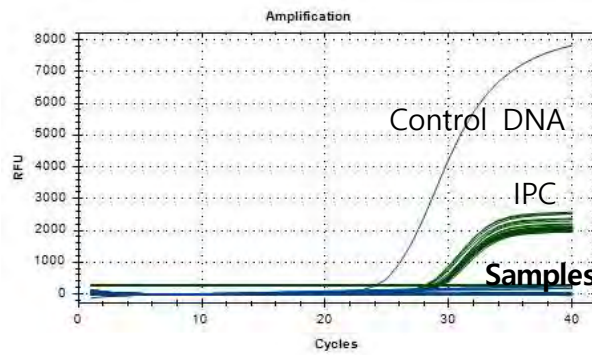
Sample No. 1 - 94



Sample No. 95 - 188

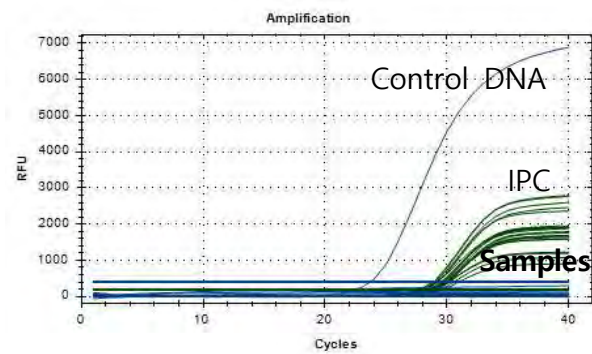


Sample No. 189 - 282

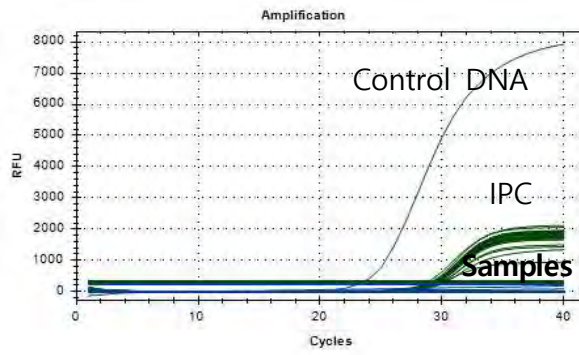


Sample No. 283 - 300

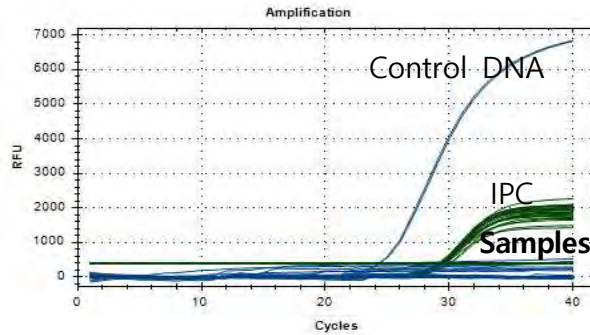
- 멧돼지 시료 qPCR 결과(500건)



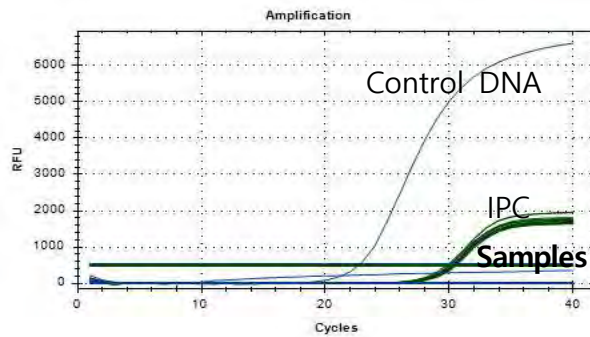
Sample No. 1 - 94



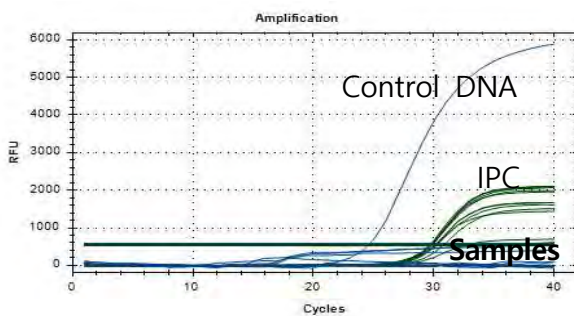
Sample No. 95 - 188



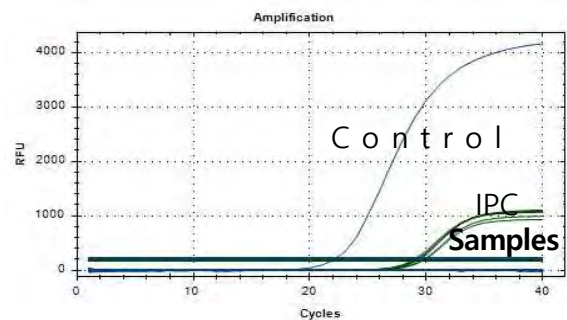
Sample No. 189 - 282



Sample No. 283 - 376



Sample No. 377 - 470



Sample No. 471 - 500

- 모든 시료 ELISA 결과(300건)
- ID screen ASF Ab ELISA kit
전 300건 모두 음성
- ASF Oral fluid Ab ELISA ki

구강액 시료 300건에 대한 ELISA 결과 24건에서 ASFV Antibody 양성(8%)이 확인되었다. 해당 양성 구강액에 대한 qPCR, 혈청 ELISA에 대한 검사 결과를 대조한 결과 모두 음

성임을 확인하여 구강액 ELISA 키트의 비특이반응으로 판단하였다.

표 29. 사육 돼지에 대한 ASFV 항체 검사 결과

시료 번호	지역	농가 수	두수	항체 검사 결과							
				혈청				구강액			
				계	양성	음성	%	계	양성	음성	%
	합계	30	300	300	0	300	100	300	24	276	8
1 - 50	청주	5	50	50	0	50	100	50	8	42	16
51 - 100	충주	5	50	50	0	50	100	50	3	47	6
101 - 150	음성	5	50	50	0	50	100	50	3	47	6
151 - 200	진천	5	50	50	0	50	100	50	4	46	8
201 - 250	괴산	5	50	50	0	50	100	50	3	47	6
251 - 300	제천·단양	5	50	50	0	50	100	50	3	47	6

○ ASFV 음성 시료 활용

- 확보된 ASFV 음성 시료에 대하여 개발 중인 ASFV 신속 진단 키트에 대한 음성 대조군으로 사용하여 유효성을 평가함

2-5. ASFV 양성 패널을 이용한 핵산 추출장비 및 진단키트 성능 평가

가. 필요 및 목적

○ 농림축산검역본부에서 협조받은 ASF 정도 관리용 ASFV 양성 패널(혈액+합성 DNA)을 이용하여 국내 동물방역기관에 보급되어 있는 주요 핵산 추출 장비의 추출 성능과 시판 ASFV qPCR kit에 대한 성능 평가를 통해 동물방역기관의 ASFV 진단을 위한 최적 조건 수립

나. 재료 및 방법

○ ASFV 양성 패널

- 농림축산검역본부에서 정도관리용으로 제조된 100copy number의 ASFV 양성 패널(혈액+합성 DNA)을 공급받아 사용하였다, PBS와 혼합하여 10진 단계 희석(100, 10, 1, 0.1) 후 각 희석 단계별 양성 패널 150 μ l를 핵산 추출에 사용하였다.

○ 핵산추출 장비 성능 평가

- 국내 동물방역기관에 보급되어 있는 핵산 추출장비 2종(A사, B사)에 대하여 10진 단계 희석한 양성 패널로부터 핵산을 추출하였다. 추출 조건은 장비 제조사의 혈액 중 핵산 추출에 최적화된 권장 프로토콜을 사용하였다.

A사 추출장비 프로토콜	B사 추출장비 프로토콜
① Proteinase K 20 μ l와 시료 150 μ l을 혼합한 후 카트리지에 주입 ② heating block 위에서 Lysis 5분 ③ washing 1분 ④ washing 1분 ⑤ evaporation 10분 ⑥ elution 3분 50 μ l	① Proteinase K 10 μ l와 시료 150 μ l을 혼합한 후 카트리지에 주입 (이 후 세부 조건은 공개되어 있지 않음) . . . ⑥ elution 50 μ l

○ qPCR

- ASFV qPCR 키트(Kogene, Korea)를 이용해 qPCR을 실시하였다. 제조사의 사용 설명서에 따라 5 μ l의 template DNA와 PCR premix 15 μ l를 혼합 후 스피ندا운 하여 제조사의 조건에 따라 반응을 수행하였다.

Fluorophore	Target
FAM	ASFV
JOE(VIC or HEX)	Internal control

Temperature	time	cycle
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	5 sec	40
60°C	30 sec	

○ ASFV qPCR 키트 성능 평가

- 국내 동물방역기관에서 ASF 진단에 주로 사용하고 있는 qPCR 진단액 2종(A사, B사)을 대상으로 하였다. 10진 단계 희석(100, 10, 1, 0.1) 한 양성 패널에서 자동화 핵산 장비 (Magpurix, Korea)를 이용하여 핵산 추출하여 qPCR에 사용하였다.

다. 결과

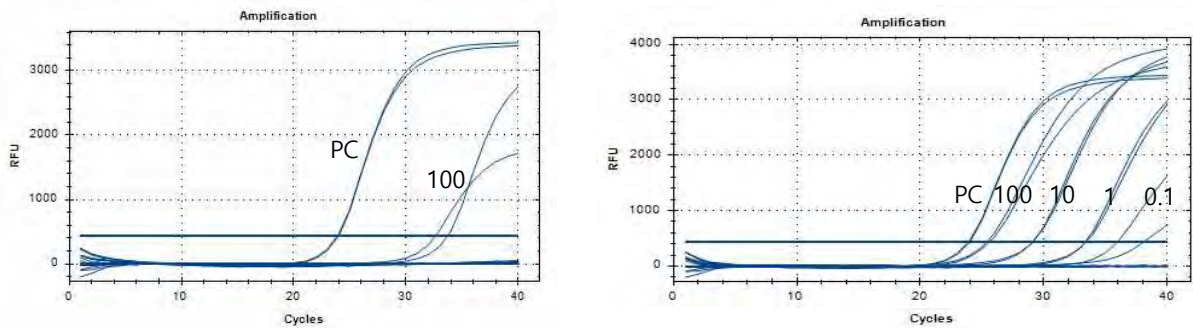


그림 46 타사 추출장비 비교분석 결과 (A사 및 B사)

표 4. A사 추출장비를 이용한 ASFV qPCR 결과

kogenebiotech		100 copy/rxn	10 copy/rxn	1 copy/rxn	0.1 copy/rxn	PC
A사	ct value	32.62	N/A	N/A	N/A	24.02
		33.7	N/A	N/A	N/A	23.89
	Average	33.16	-	-	-	23.955
	STDEV	0.54	-	-	-	0.065

표 5. B사 추출장비를 이용한 ASFV qPCR 결과

kogenebiotech		100 copy/rxn	10 copy/rxn	1 copy/rxn	0.1 copy/rxn	PC
B사	ct value	25.59	29.11	33.41	35.98	24.02
		25.38	29.12	33.34	38.11	23.89
	Average	25.485	29.115	33.375	37.045	23.955
	STDEV	0.105	0.005	0.035	1.065	0.065

- 분석적 성능 비교평가 결과 양성 판정 ct 값 38 이하를 기준으로 A사 추출 장비는 100 copy/rxn만이 양성으로 판정되는 반면, B사는 1 copy/rxn까지 양성으로 판정되었다.

○ ASFV qPCR키트에 대한 성능 평가

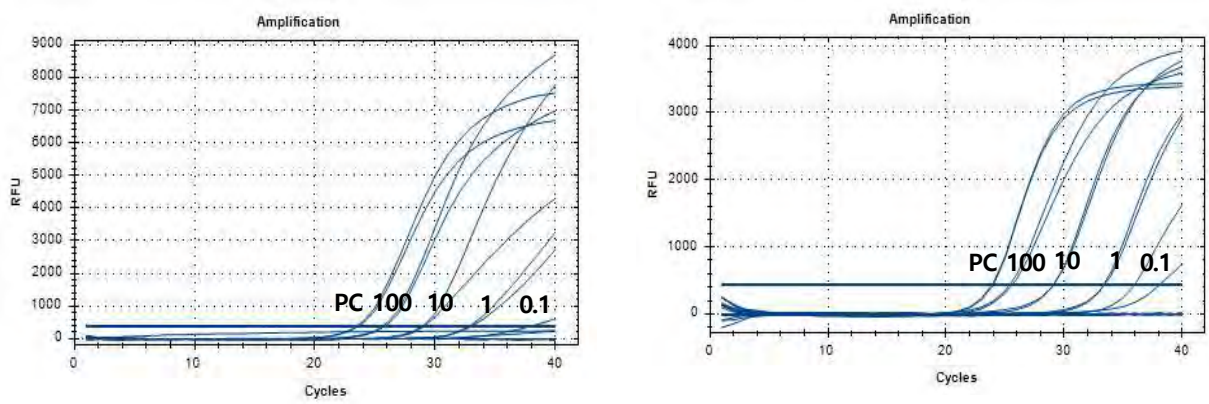


그림 47 타사 PCR 키트 비교 분석 결과 (A사 및 B사)

표 6. A사 ASFV qPCR 키트를 이용한 결과

		100 copy/rxn	10 copy/rxn	1 copy/rxn	0.1 copy/rxn	PC
A사	ct value	25.47	29.02	32.87	37.7	23.32
		25.7	28.81	32.66	37.71	23.47
	Average	25.585	28.915	32.765	37.705	23.395
	STDEV	0.115	0.105	0.105	0.005	0.075

표 7. B사 ASFV qPCR 키트를 이용한 결과

		100 copy/rxn	10 copy/rxn	1 copy/rxn	0.1 copy/rxn	PC
B사	ct value	25.59	29.11	33.41	38.11	24
		25.38	29.12	33.34	35.98	24.02
	Average	25.485	29.115	33.375	37.045	24.01
	STDEV	0.105	0.005	0.035	1.065	0.01

- 분석적 성능 비교평가 결과 양성 판정 ct 값 38 이하를 기준으로 A사, B사 qPCR 키트 모두 0.1 copy/rxn까지 양성으로 판정되어 유사한 성능을 나타냈다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 단백질 항원 생산, 정제, 보관조건 스크린 및 최적화
 - 최대 생산 수율의 ASFV p72, p205, 및 p104 재조합 발현 세포주 획득
 - 생산공정을 고려하여 정제단계 간소화 및 효율화 (48시간 이내)
 - 생산 후 보관 과정 최적화 (반복 동결/해동의 오차 극복)
- 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 단백질 항원 발굴
 - 진단 시약의 국내 경쟁력 제고를 위해 ASFV p30 과 p62 재조합 형태 항원 절편 생산
 - 상업화된 진단 항원의 정성 및 정량적 생산공정 오차 극복을 위한 ASFV 융합 단백질 항원 생산
 - 최대 수율 재조합 대장균 세포주 획득하고 재조합 바이러스 항원 생산, 정제 및 보관 조건을 최적화
- 아프리카돼지열병바이러스 특이적 단클론 항체 세포주 발굴
 - 재조합 ASFV p72, p205, 및 p104 단백질 항원의 대량 정제 후 이를 이용하여 단클론 항체 세포주를 스크린 함
 - 각 항원 특이적 (재조합 ASFV p72, p205, 및 p104) 당 10개, 총 30개의 단클론 항체 세포주를 선별하고 단클론 항체를 생산함
- 아프리카돼지열병바이러스 특이적 분자진단 primers 및 probe 발굴
 - 아프리카돼지열병바이러스 유전자 분자진단을 위해 real-time PCR에서 사용되는 양성 검체의 선별적 특이성이 탁월한 primers 및 probe를 스크린하고 그 유용성을 분석하여 분자진단장비 및 1회용 카트리지를 개발에 활용함
- 아프리카돼지열병바이러스 감염 진단(평가) 위한 검체 확보
 - 러시아 국립 수의과학 연구소로부터 ASF 양성 및 음성 검체 총 20개 확보
 - 국내 사육돼지 300건 이상

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

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2020~2021)			가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)	계	
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문(SCI)	목표(단계별)	1	1	
		실적(누적)	1	1	
	논문(비SCI)	목표(단계별)	1	1	
		실적(누적)			
	논문평균IF	목표(단계별)	2	2	
		실적(누적)	3.19		
	특허출원	목표(단계별)	2	2	33.40
		실적(누적)	3	3	33.40
	특허등록	목표(단계별)			
		실적(누적)			
	학술발표	목표(단계별)	1	1	4.44
		실적(누적)	4	3	4.44
	연구시설·장비	목표(단계별)			
		실적(누적)			
	저작권(소프트웨어, 서적 등)	목표(단계별)			
		실적(누적)			
	생명자원	목표(단계별)			
		실적(누적)			
표준화(국내, 국제)	목표(단계별)				
	실적(누적)				
학합물	목표(단계별)				

연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	신품종	실적(누적)			
		목표(단계별)			
	기술실시(이전)	실적(누적)			
		목표(단계별)			
	기술료	실적(누적)			
		목표(단계별)			
제품화	목표(단계별)	1	1	22.20	
	실적(누적)	0	0	0	
기술인증	목표(단계별)	1	1	11.10	
	실적(누적)	2	2	11.10	
인력양성(졸업자 수)	목표(단계별)				
	실적(누적)				
정책활용	목표(단계별)	1	1	3.3	
	실적(누적)	1	1	3.33	
타연구에의활용	목표(단계별)				
	실적(누적)				
홍보(전시)	목표(단계별)	1	1	3.33	
	실적(누적)	0	0	0	
포상 및 수상	목표(단계별)				
	실적(누적)				
기타 연구개발활용	목표(단계별)				
	실적(누적)				
계	목표(단계별)	12	12	100	
	실적(누적)	14	14	74.47	

- 아프리카돼지열병 진단 신속진단 연구개발과제와 연관된 학술논문
 - Structure-based molecular characterization of the LitR transcription factor from *Listeria monocytogenes*" [Biochem. Biophys. Res. Commun. 600(2022) 142-149] 게재 완료함 (IF3.190)
- 학술발표: 3건
 - 염소농장으로 인한 대규모 사람큐열 발생사례 (2021년도 제43차 한국동물위생학회 학술발표대회)
 - Development of Recombinant Viral Antigen for p205 From African Swine Fever Virus (2022, 49th Annunal meeting & International symposium, The Korean society for microbiology and biotechnology)
 - Study for Recombinant Viral Antigen, EP402R, of African Swine Fever Virus (2022, 49th Annunal meeting & International symposium, The Korean society for microbiology and biotechnology)
- 지식재산권: 3건 출원
 - 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p62 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0039705)
 - 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p30 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0034757)
 - 아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0050971)
- 시제품 등 제품화: 2건
 - 유전자증폭장치 (geneDtech2.0): 현장진단 기기의 예상 도매 가격은 2000만원이며 1회용 카트리지의 경우 개당 2만원으로 해외 경쟁사보다 저렴한 공급이 기대됨
 - Indirect ELISA 시제품 (PI-ASF Ab ELISA Kit) :
 - 1) 국내 : 현재 전체 사업비 중 ~50% 점유율 목표, 연간 10억원 이상
 - 2) 해외 : 중국, 베트남 등 돼지 수요가 많은 국가에서 공장형 축산업 형성과 진단키트가 활성화했을 경우 국산 제품의 우수성과 효율적인 가격정책으로 연간 30억원 이상의 매출 효과 기대
- 국내외 인증: 2건
 - 실시간 유전자증폭장치, geneDtech2.0 (제조인증 제외 제인 21-4611호, 제조허가 제 337-001호)
 - Design & development, manufacture, sales and services of IVD reagents for infections disease marker, DNA amplifier, extractor nucleic acid (ISO 13485:2016, USK-2021-M-2014)
- 정책활용제안: 1건

- 아프리카돼지열병바이러스(ASF)진단 신속 진단 kit 개발의 국가 연구과제 수행 결과 정책 활용 건의
(ASFV 진단용 Real-time RPA 개발 관련, 충청북도동물위생시험소)

< 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2020~2021)	n단계 (YYYY~YYYY)		
1	분석적 최소 민감도	%	30%	Thermo (미국)	95%이 상 양성 검출	80-90% 양성검출 민감도	95%이상 양성 검출		양성에 대한 검출
2	분석적 특이도	%	30%	Thermo (미국)	99%이 상 음성 검출	90% 이상 특이도	95%이상 음성 검출		음성에 비특이 제거
3	재현성	%	40%	Thermo (미국)	99%이 상 일정한 수치	95%이상 재현성	95%이상 일정한 수치		반복 재현성

(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
1	Structure-based molecular characterization of the LtrR transcription factor from <i>Listeria monocytogenes</i>	Biochem. Biophys. Res. Commun.	김정훈	609	USA	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2022.06.18	1090-2104	50%

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	제43차 한국동물위생학회 학술발표대회	변현섭	2021.09.15	충청북도 증평	대한민국
2	49th Annual meeting & International symposium	김정훈	2022.06.23	경상북도 경주	대한민국
3	49th Annual meeting & International symposium	박재완	2022.06.23	경상북도 경주	대한민국

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, 신품종, 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	아프리카돼지열병 바이러스 유래 p30 단백질 절편 및 이의 용도	대한민국	연세대학 교 원주산학 협력단	2022.03 .21	10-2022 -003475 7				100%		
2	아프리카돼지열병 바이러스 유래 p62 단백질 절편 및 이의 용도	대한민국	연세대학 교 원주산학 협력단	2022.03 .30	10-2022 -003970 5				100%		
3	아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도	대한민국	연세대학 교 원주산학 협력단	2022.04 .30	10-2022 -003970 5				50%		

○ 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

□ 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		
1	체외진단의료기기	한국의료기기안전정보원	에이비아이(주) 실시간유전자증폭장치, geneDtech2.0	체외 제인 21-4611호	2021.07.16	대한민국
2	동물용의약품 제조	농림축산검역본부	유전자증폭장치(geneDtech2.0)	허가번호 제 337-001호	2021.09.02	대한민국
3	Medical Device Quality Management System Certificate	ISO International Certification Body	Design & Development, Manufacture, Sales and Service of Infectious Disease Marker (Tuberculosis Diagnostic Kit), DNA Amplifier, Extractor Nucleic acid	ISO 13485:2016	2022.01.17	US

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	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.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹	표준명	표준기구명 ²	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(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			(주)파이지노믹스					

□ 기술 실시(이전)

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

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹	사업화 형태 ²	지역 ³	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1」 기술이전 또는 자기실시
- * 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 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	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		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
			yyyy년	yyyy년	
1	아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발연구	연세대학교 원주산학협력단	2021년	2021년	대학원 진학
합계					

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 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)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	제안	국가 연구과제 수행 결과 정책 활용 건의	충청북도동물위생시험소, 방역과	2021	제안

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					

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](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
기탁	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ ASFV 단백질 항원 발현	-재조합 바이러스 항원 생산 -재조합 바이러스 항원 특허 출원	○ 100
○ ASFV 단클론 항체 생산 세포주 개발	-ASFV 항원 특이적 단클론 항체 생산 개발 -ASFV 항원 특이적 단클론 항체의 항원성 선별 -ASFV 항원 특이적 단클론 항체 생산 세포주	○ 100
○ ASFV 신속진단키트 개발 및 유용성 평가	-ASF RT-PCR의 현장 활용형 POCT 장비 및 키트리지 개발 -ASF RPA primers 와 probe 개발 -ASF ELISA 키트 개발 -유용성 비교 평가 -ASF 진단 장비 제조 인증 및 제조 허가	○ 100
○ ASFV 감염 양성 및 음성 혈청 확보	-해외수입완료 -국내검체 확보	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

해당사항없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 단백질 항원의 발현 시스템의 감염병 진단 및 예방에 기여
 - 아프리카돼지열병바이러스의 재조합 형태 대장균에서의 생산은 단백질 공학적으로 가능하나 그 유용성을 평가하며 시도된 적은 국내외 보고된 적이 매우 적음.
 - 대장균 세포를 이용한 재조합 단백질은 생산은 저렴한 비용으로 24시간 이내 높은 생산 수율로 바이러스 항원 단백질을 생산할 수 있다는 상업적 활용이 매우 탁월함.
 - 본 연구개발과제에서 적용된 항원 단백질 절편의 재조합 형태 발현 construct 디자인 아이디어 및 융합 단백질 항원 생산은 타 감염성 바이러스 항원 생산에 기여하게 됨
 - 돼지를 포함한 소, 닭 등 다양한 바이러스와 세균성 질병의 원인 항원 생산에 기여함
 - 감염성 질병에 대한 진단법에 반드시 필요한 재조합 항원을 제공하여 시료의 국산화, 국제적 우월성, 감염성 질병의 진단과 질병의 전파차단의 방역에 기여함.
- 타 감염병 진단기술의 활용
 - 본 연구과제에서는 감염병 신속진단 연구개발을 진행하여 항원, 항체 및 유전자를 진단하는 분자수준의 진단법을 모두 접근함. 이러한 유전자 진단의 real-time RT-PCR과 RPA기술을 이용한 진단법, 그리고 항원과 항체를 이용한 ELISA 기법을 다각도로 비교하며 평가하여 다른 감염병에 대한 연구개발에서도 다각적인 연구과제내용의 계획에 기여함
 - 해외에서 수입한 고가전문장비와 전문인력이 확보되지 않더라도 감염 발생의 의심 현장에서 신속하게 감염성 질병을 진단할 수 있는 체계 구축에 기여함
- 감염병 진단 연구개발 전문 인력 양성
 - 본 연구개발과제를 수행하여 감염병의 원인과 현상을 이해하고 감염병의 신속 현장 진단이 가능한 진단키트 개발 연구를 진행할 대학원생 및 연구원 참여로 감염병 위기 대처의 전문 인력 양성에 기여함

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 국내 추가발생에 대한 대비

- 현재 아프리카 돼지열병의 국내 유입으로 인한 국내 발생 후 아프리카 돼지열병에 대한 진단법 및 진단키트는 일부 개발되어 있지만, 외국제품에 의존성이 높음.
- 아프리카 돼지열병이 국내 돈사에서 발생한 후 최근 멧돼지에서 계속 발생하고 있어 돈사에서 발생할 가능성이 매우 높으며 외국의 사례가 이를 증명하고 있음
- 아시아를 포함한 세계의 다른 나라에서 감염축이 발생하고 있는 질병에 대해서 국내 발생 질병들과 동일한 수준으로 진단이 가능하도록 준비하여 국가 방역에 만전을 기해야 할 때 임.

○ 국내 아프리카돼지열병에 대한 진단법 및 진단 체계 확립

- 현재 실험실 진단에 사용되는 ELISA와 RealTime-PCR는 많은 시간이 소요되는 검사방법에 신속성에 정확성을 더하는 등온PCR 및 CRISP기술기반 진단체계 확립에 활용
- 해외유입감염병에 대한 진단법을 확립함으로써 고가의 수입 진단제를 대체하여 사용할 수 있음
- 진단체계를 확립함으로써 해외유입가능한 법정감염병에 대한 국민보건에 대한 국가적 의무를 수행하는데 활용할 수 있음
- 해외유입질병에 대한 방역감시체계를 구축함으로써 효율적인 진단체계 운용과 정확한 질병 자료를 제공하는데 활용

○ 제품화 관련 국내외 계획과 기대 효과

- ASF 진단의 경우 유전자 진단법에 의존하고 있으나 발병 심각성과 전파력과 강하여 향후 전수예찰조사 체계로 전환될 가능성이 높으며 이 경우 전문 검사자 및 고가의 장비없이 신속하고 정확한 진단이 가능한 면역 ELISA 진단 제품이 필수적 임
- 파이지노믹스는 파이지노믹스는 현 점유율 ~30 %에 달하는 소 결핵병 진단키트(Plron gamma TB Elisa kit)를 이미 자체 개발하여 제조, 생산 중이며 이를 바탕으로 하는 제품화 과정의 전문성을 확보하였음. 이에 우수하고 경쟁력 있는 제품 보급을 2023년 기대하고 있음. 국내 검체 수급이 불가능한 임상시험의 한계를 극복하기 위해 러시아 및 키르기즈스탄과 협약을 통해 현지 임상 검체를 적용하여 제품 개발을 진행함
- 출시 예정인 진단 키트(PI-ASF Ab ELISA Kit)의 예상 판매가 국내 kit 당 ₩1,848,000 / 480 test (두 당 비용 ₩3,850)임. 예상 매출액 및 대상 국가는 국내의 경우 현재 전체 사업비 중 ~50% 점유율 목표, 연간 10억원 이상이며, 국외의 경우 중국, 베트남 등 돼지 수요가 많은 국가에서 공장형 축산업 형성과 진단키트가 활성화되었을 경우 국산 제품의 우수성과 효율적인 가격정책으로 연간 30억원 이상의 매출 효과 기대함

○ 유사증상 및 유사바이러스 질환과의 감별 신속 진단

- 아프리카 돼지열병과 유사 증상 및 유사바이러스 질환인 돼지열병 등과 같은 여러 질환을 현장에서 신속하게 감별하여 국내 유입 및 확산을 예방할 필요가 있음.
- 본연구과제에서 개발하는 아프리카 돼지열병에 대한 진단키트를 이용하여 신속하게 감별 스크리닝 및 대응 가능

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	1
	비SCIE	2
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	1

	박사	1
	계	
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
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
2.	1) 과학적 성과 증빙자료-논문1
	2) 과학적 성과 증빙자료-학술발표 3건
	3) 기술적 성과 증빙 자료-지적재산권 3건
	4) 기술적 성과 증빙 자료-기술 및 제품 인증 3건
	5) 경제적 성과 증빙 자료-시제품 제작 1건
	6) 경제적 성과 증빙 자료-고용 창출 1건
	7) 사업적 성과 증빙 자료-정책 활용 제안 1건
	8) 사업적 성과 증빙 자료-전문 인력 양성 1건

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업 아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		321017-1	
사업구분	가축질병대응기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	연세대학교 원주산학협력단			연구책임자	홍민선
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021. 04. 01 - 202. 03. 31	400,000	50,100	450,100
	계	2021. 04. 01 - 202. 03. 31	400,000	50,100	450,100
참여기업	(주)파이지노믹스, 에이비아이(주), 충북동물위생시험소				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.05.13

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
연세대학교 원주산학협력단	부교수	홍민선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	홍민선
-----	-----

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량

- 아프리카돼지열병에 대한 항원 및 항체검사법을 개발하기 총 7개의 ASFV 항원을 선별하여 유래 재조합 단백질 항원의 발현과 정제를 스크린하고 최적화함, ASFV p72, p205, p104, p30, p62 및 p72와 p205의 융합형태 재조합 단백질을 성공적으로 생산하고 저장 조건을 획득함. 재조합 바이러스 항원을 이용한 ASFV-ELISA검사법을 개발하고 최적화하여 시제품을 제작함. 또한 아프리카돼지열병감염증에 대한 양성검체와 음성검체를 이용하여 그 유용성을 확인하고 진보성을 인정받아 지식재산권을 출원하였음.
- 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 단백질 항원을 이용하여 단클론 항체를 선별하여 30개의 단클론 항체 생산 세포주를 개발하고 각 단클론 항체의 바이러스 항원 반응성을 확인함.
- 아프리카돼지열병을 체외 현장 신속 진단 할 수 있는 현장활용형(point of care test, .POCT) 장비 및 1회용 카트리지를 개발하고 제조 인증 및 품목 허가를 획득함
- 아프리카돼지열병의 진단을 위한 ELISA 키트를 개발하고 시제품을 제작하여 자체 평가함
- 아프리카돼지열병을 신속·정확하게 진단하기 위하여 새로운 기술인 RPA를 적용하여 아프리카돼지열병바이러스의 P30과 P72유전자에 대한 primer와 probe를 디자인·제작하여 시제품을 제작하였고, 러시아 국립수의과학연구소에서 제공받은 아프리카돼지열병바이러스 표준 DNA를 이용하여 민감도와 특이도를 측정하여 뛰어난 효용성을 확인하고 정책활용제안함
- 본 연구과제를 통하여 아프리카돼지열병에 대한 신속진단키트개발 연구를 실시하여 시제품 등 제품화 2건, 국내외 기술인증 2건, 지식재산권 3건 출원, 국내외 학술발표 3건, 논문 1건 게재완료 및 1건 투고예정, 정책활용제안 1건 등의 성과를 나타내었음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량

- 가축 감염질환 진단 및 방역에 대한 파급효과
 - 돼지를 포함한 소, 닭 등 다양한 바이러스와 세균성 질병이 발생하고 있어 이에 대한 대책이 필요한데, 감염성 질병에 대한 진단법을 적용함을 통하여 감염성 질병의 진단과 질병의 전파차단에 크게 기여할 것임
 - 본 연구과제에서 수행한 아프리카돼지열병은 아프리카에서 유래된 질병이지만, 러시아와, 중국 및 여러 아시아 국가에서 발생하고 있어, 해외에서 발생하던 질병이 2019년에 국내에 유입되어 발생하였고, 현재 멧돼지를 통해 계속 전파되고 있어, 이에 대한 진단 및 방역정책에 기여할 것임
- 감염병 진단기술의 활용
 - 본 연구과제에서는 기존의 진단법에 사용되는 real-time RT-PCR 뿐만 아니라, 20분이내에 현장에서 신속·정확하게 질병을 진단가능한 RPA기술을 이용한 진단법을 개발하고 비교평가하여 다양한 감염성 가축 및 사람의 질병 진단에 다양하게 활용가능
 - 기존의 고가전문장비와 숙련된 기술자가 없더라도 감염 발생의 의심 현장에서 감염성 질병을 신속하게 진단케 함
 - 재조합 바이러스 항원과 항원 특이적인 단클론 항체를 개발하고 생산 완료하여 ELISA 등 신속진단키트 개발 및 재료의 국산화
- 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 단백질 항원의 발현 시스템 파급효과
 - 아프리카돼지열병바이러스의 재조합 단백질을 이용하여 아프리카돼지열병에 대한 항체검사법으로 사

용할 수 있지만, 아프리카돼지열병에 대한 백신개발에 재조합단백질을 활용할 수 있어, 아프리카돼지열병바이러스 단백질 발현을 통하여 연구 및 진단과 백신으로서의 활용성이 매우 넓어 파급효과가 매우 높음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량

- 현장 적용 RPA 등은 PCR 검사법
 - 본 연구과제에서 개발한 바이러스 RPA 검사법은 다른 다양한 바이러스성 검사에 다양하게 적용가능
 - 기존의 real-time PCR의 경우 약 1시간 30분 - 2시간 정도가 필요하였으나, RPA 기반 유전자증폭법은 20분 이내에 결과를 판정할 수 있어 신속·정확하게 진단하여 신속하게 방역대책을 세우는 매우 효과적임
 - 기존의 유전자진단법은 전문장비가 구비된 실험실에서만 진단이 가능하였으나 RPA 검사법은 고가의 장비 필요없이 현장에서 진단용으로 활용 가능하여 개발대상국 등 감염성 질환이 많이 발생하는 국가에 매우 효과적임
 - 고감도의 민감도를 가지고 있을 뿐 아니라 결과를 도출하는 시간이 15분 정도면 충분하기 때문에 신속한 진단을 통하여 치료 및 국가적인 질병관리 및 방역에 매우 효과적임
- 돈사 및 다양한 돼지 검체
 - 본 연구개발과제 수행기간동안 돼지 검체를 다양하게 획득하여 아프리카돼지열병 감염증 음성 및 양성 분석뿐만 아니라 돼지에서 유발하는 다른 감염성 질환 (PRRSV, PCV2, SIV 및 Mycoplasma hyopneumoniae 등)의 분석에도 활용하여 국내 돼지 질병을 효과적으로 모니터링하는 질병과리 방역 대응에 매우 효과적임
- 바이러스 항원의 절편 및 융합 항원등의 재조합 형태 개발
 - 본 연구과제에서 발굴한 바이러스 항원의 대장균 세포를 이용한 재조합 항원 단백질의 절편 생산 디자인 및 정제 과정은 다른 감염성 바이러스 항원의 생산에 활용 가능함
 - 기초연구개발을 상업화하기 위한 재조합 단백질 생산, 정제 및 보관 과정의 확립은 상업공정단계에 적극 활용되어 공정과정의 정량이고 정성적 관리 수월성 확보함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량

- 아프리카돼지열병바이러스 진단항원 발굴 및 개발
 - 아프리카돼지열병 재조합 단백질 개발하여 이를 이용한 아프리카돼지열병 항체검사법인 ASFV ELISA 키트를 제작하여 임상검체를 이용한 유용성 평가 및 신속진단검사키트 개발함
 - 아프리카돼지열병 재조합단백질을 이용한 아프리카돼지열병 항원검사에 대한 특허를 출원하였음.
- 아프리카돼지열병 항원검사법
 - Conventional PCR을 개발하여 아프리카돼지열병 뿐만 아니라 감별필요가 있는 돼지열병 등을 동시에 검출할 수 있는 검사법을 개발함
 - ASFV에 대한 real-time PCR을 보완할 수 있는 primer와 probe를 새로이 제작함. 아프리카돼지열병감염진단 유용성을 평가함.
 - 본 연구과제에서 20분 이내에 검사할 수 있는 ASFV-RPA 등은 PCR의 개발하고 아프리카돼지열병감염진단 유용성을 평가함.
- 아프리카돼지열병감염 임상 검체 확보
 - 러시아 국립수의과학연구소에서 수입허가를 받아 검체 확보
 - 아프리카돼지열병 표준 혈청 확보
 - 아프리카돼지열병 바이러스 표준 DNA

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량

본 연구개발과제를 수행하는 동안 획득된 개발결과로부터 얻어진 대표적인 연구개발 성과는 다음과 같음

○ 아프리카돼지열병에 대한 학술논문

- "Development for recombinant protein antigen of african swine fever virus" 국제 SCI급 논문 투고 준비 중임
- Structure-based molecular characterization of the LItR transcription factor from *Listeria monocytogenes*" [Biochem. Biophys. Res. Commun. 600(2022) 142-149] 게재 완료함 (IF3.575)

○ 국내외 학술발표: 3건

- 염소농장으로 인한 대규모 사람큐열 발생사례 (2021년도 제43차 한국동물위생학회 학술발표대회)
- Development of Recombinant Viral Antigen for p205 From African Swine Fever Virus (2022, 49th Annunal meeting & International symposium, The Korean society for microbiology and biotechnology)
- Study for Recombinant Viral Antigen, EP402R, of African Swine Fever Virus (2022, 49th Annunal meeting & International symposium, The Korean society for microbiology and biotechnology)

○ 지식재산권: 3건 출원

- 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p62 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0039705)
- 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p30 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0034757)
- 아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도(10-2022-0050971)

○ 시제품 등 제품화: 2건

- 유전자증폭장치 (geneDtech2.0)
- Indirect ELISA 시제품 (PI-ASF Ab ELISA Kit)

○ 국내외 인증: 2건

- 실시간 유전자증폭장치, geneDtech2.0 (제조인증 제외 제인 21-4611호, 제조허가 제 337-001호)
- Design &development, manufacture, sales and services of IVD reagents for infections disease marker, DNA amplifier, extractor nucleic acid (ISO 13485:2016, USK-2021-M-2014)

○ 정책활용: 1건

- 아프리카돼지열병바이러스(ASF)진단 신속 진단 kit 개발의 국가 연구과제 수행 결과 정책 활용 건의 (ASFV 진단용 Real-time RPA 개발 관련,충청북도동물위생시험소)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
ASFV 단백질 항원 발현	20	100%	○ASFV유래 재조합 p72, p104, p205 대량 생산 및 정제 조건 최적화 ○ASFV유래 재조합 p30 와 p62 항원 생산의 국내화 및 p72와 p205 융합단백질 생산 ○ASFV유래 재조합 항원 단백질 생산 및 유용성 평가
ASFV 단클론 항체 생산 세포주 개발	20	100%	○ASFV유래 재조합 p72, p104 및 p205 단백질을 이용한 단클론 항체 선별 및 생산 세포주 개발 ○ASFV유래 p72, p104 및 p205의 단클론 항체 생산 및 반응성 평가
ASFV 신속진단키트 개발 및 유용성 평가	20	100%	○Indirect ELISA 시제품 (PI-ASF Ab ELISA Kit)
ASFV 분자진단 POCT와 1회용 카트리지를 개발 및 최적화	20	100%	○개발 완료 ○동물용 의료가 제조허가 완료 ○LOD 10copies/μL
ASFV 감염 양성 및 음성 혈청 확보	20	100%	○해외로부터 수입 완료 ○국내 검체 확보
합계	100	100%	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

아프리카돼지열병이 중국 등 아시아 국가로 감염병의 국내 유입 차단을 노력하였으나, 철저한 방역정책에도 불구하고, 유럽-아시아-북한-대한민국으로의 지리적 연결성으로 2019년 국내, 아프리카돼지열병이 멧돼지 사체에서 보고되었음. 이후, 이후 지속적으로 국내에서 아프리카돼지열병의 발생이 보고되소 있음. 무엇보다 야생 멧돼지에서 아프리카돼지에서 열병이 최초 휴전선 근처에서 발생한 이후, 감염병의 발생 보고는 남쪽 지역으로 급격하게 확장하고 있음. 이러한 국내외 아프리카 돼지 열병의 파급이 지속 확대하며 감염병의 신속 진단 개발 연구와 방역 대처가 매우 시급함. 이러한 상황에서 본 연구에서 개발한 아프리카돼지열병에 대한 진단법을 활용하게 된다면 아프리카돼지열병에 대하여 신속·정확하게 진단할 수 있게 되고, 또한 구강액 채취를 통하여 사육되고 있는 집돼지에 대한 아프리카돼지열병 및 다른 돼지질병에 대한 모니터링이 가능하여 아프리카돼지열병에 대한 방역에 크게 기여할 것으로 생각되어, 국내 뿐만 아니라 해외에 제품을 수출하게 됨으로써 경제적인 효과도 크게 나타날 것으로 판단됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구개발기간동안 COVID-19 의 전세계적인 판데믹 전염병으로 인한 국내외 제한 조치로 연구개발과정 진행이 지연되었고 연구개발을 위한 시료 확보가 매우 어려웠음. 특히 아프리카돼지열병 바이러스 감염된 돼지의 검체를 이용한 평가 및 분석은 매우 제한적으로 진행됨.
- 아프리카돼지열병바이러스에 의한 감염 발생이 국내에서도 간헐적으로 보고되고 있으나, 본 연구에서 개발한 아프리카돼지열병에 대한 진단법의 효용성을 평가할 수 있는 음성 및 양성 표준검체의 확보가 매우 어려웠음.
- 본 연구개발 참여기관 연구원들의 전문성과 유기적인 연구개발노력으로 COVID-19 사태에도 불구하고 계획한 연구개발내용을 성공적으로 진행함
- 국제적으로 인정받는 아프리카돼지열병 연구기관인 러시아 국립수의과학연구소의 협력과 표준검체 제공을 통해 본 연구에서 개발한 아프리카돼지열병 진단법의 효용성을 평가할 수 있었음.
- 아프리카돼지열병 감염병을 진단할 수 있는 유전자와 항원 및 항체 등 분자 진단법에 필요한 시약의 국내 연구진이 개발하고 생산하며 이를 진단 장비 및 키트도 개발하고 일부 제조 인증과 허가도 획득하였으며 시제품은 향후 제조단계를 보완하여 제품화 할 것임

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구과제에서 개발된 아프리카돼지열병바이러스 유래 재조합 항원 및 단클론 항체를 이용한 진단법 및 진단키트의 추가적인 효용성 평가를 통하여 진단키트로 제작하고 제품허가를 획득하여 국내외 아프리카돼지열병바이러스 감염병의 신속진단으로 적극적인 방역관리에 활용이 기대됨.
- 본 연구개발과제에서 도출된 바이러스 감염병의 신속진단개발 기술을 이용하여 다른 감염성 가축질병의 신속하고 정확한 진단이 가능한 키트 개발에 기여하여 국내 축산 방역에 기여하고자 함
- 또한 본 연구에서 수행된 연구개발결과는 국제학술대회 발표 및 국제학술논문 게재 예정임.

[별첨 1]

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	아프리카 돼지 열병 바이러스 (ASF) 진단 신속 진단 kit 개발			
주관연구개발기관	연세대학교 원주산학협력단		주관연구책임자	홍민선
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	400,000,000	50,100,000		450,100,000
연구개발기간	2021. 04. 01. - 2022. 03. 31.(12개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(시제품 등 제품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 아프리카 돼지열병의 항원 개발 및 항원검출 항체 개발	<ul style="list-style-type: none"> • ASFV 재조합 항원 단백질 생산 (p72, p105, p204, p30, p62 및 F20572 등 총 5건) • ASFV 재조합 항원 단백질 생산 및 유용성 평가 지적 재산권 출원 (p30, p62 및 F20572 등 총 3건) • ASFV 재조합 항원검출 단클론 항체 개발 및 항원성 평가 (p72, p105 및 p204의 단클론 항체생산 세포주 획득, 각 10, 총 30개)
② ASF 현장 활용형의 신속 진단 kit 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 체외진단 실시간 유전자 증폭장치 개발 (RT-PCR) • 실시간 등온증폭장치 개발 프라이머 스크린 (RPA; Recombinase polymerase amplification) • Indirect ELISA 개발
③ 아프리카 돼지열병의 현장형 신속, 정밀 분자진단 검사법 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 체외진단 실시간 유전자 증폭장치 및 1회용 카트리지 개발 • 실시간 등온증폭장치 RPA 개발 • Indirect ELISA 시제품 제작 및 유용성 평가 (PI-ASF Ab ELISA Kit)
④ 현장형 신속 진단 시스템의 현장 적용 사례 확보 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> • 체외진단 실시간 유전자 증폭장치 제조 인증 및 제조 허가 (geneDtech2.0) • RPA 유용성 비교 평가 및 정책제안 (RPA, 20분 이내 신속성) • PI-ASF Ab ELISA Kit 시제품 제작 및 유용성 비교 평가와 매뉴얼 제작

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (%)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	33.4					22.2			22.2		11.1			4.4			3.3	3.3		
최종 목표	2					1			1		1	2	2	2	1			1		
당해 년도	목표	1				1			1		1	1	1	2	1			1	1	
	실적	3							1		2	1		3.19	6		1	1		
달성률 (%)	150					200			100		200	-	-	159.5	600		-	100		

[별첨 2]

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	ASFV 항원 생산 및 항원검출 단클론 항체 생산 세포주
②	ASFV 감염 체외진단 실시간 유전자 증폭장치 (RT-PCR primers 와 진단 시약들)
③	ASFV 진단 실시간 등온증폭진단법 (RPA primers 와 진단 시약들)
④	ASFV 감염 진단 ELISA Kit (진단 시약들)

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	√	√	√	√	√	√		√		
②의 기술		√	√	√	√			√		
③의 기술		√	√	√	√				√	
④의 기술		√	√	√	√			√		

* 각 해당란에 √ 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	논문게제완료 및 항원과 항체 이용한 신속진단키트 개발
②의 기술	ASF감염증을 비롯한 다른 감염성 질환 체외 진단법 개발에 적용
③의 기술	ASF감염증을 비롯한 다른 감염성 질환 체외 진단법 개발에 적용
④의 기술	ASF감염증을 비롯한 다른 감염성 질환 체외 진단법 개발에 적용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용예비)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 I-F	학술발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치	33.3						22.2			22.2	11.1			4.4			3.3	3.3	
최종목표	2						2			2	1	2	2	2	1		1	1	
연구기간내 달성실적	3						0			1	2	1		3.19	6		1		
연구종료후 성과창출 계획																		1	

[별첨 2]

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

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

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Corrigendum to “Structure-based molecular characterization of the LltR transcription factor from *Listeria monocytogenes*” [Biochem. Biophys. Res. Commun. 600(2022) 142–149]



Junghun Kim, Jaewan Park, Zion Choi, Minsun Hong*

Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju, 26493, Republic of Korea

The authors would like to apologize for any inconvenience caused. Correction of funding statement in Acknowledgements section. Corrected statements in Acknowledgements section

X-ray diffraction datasets were collected at beamline 7A of the Pohang Accelerator Laboratory (Korea). This study was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea and funded by the Ministry of Education (2021R1F1A1045940 to M.H.) and by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry(IPET) through Animal Disease Management Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MA-FRA)(1545022869 to M.H.).

DOI of original article: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.133>.

* Corresponding author.

E-mail address: minsunhong@yonsei.ac.kr (M. Hong).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.105>

0006-291X/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.



임상습제 침범(방지) 예방

【참고】

염소 농장으로 인한 대규모 사람 큐열 발생 사례

변현섭 · 권미나 · 한성재 · 이은정 · 김형섭 · 정복환
충청북도동물위생시험소, 충북대학교 의과대학

요약 국내 염소 사육 규모는 2014년 이후 지속적으로 증가하고 있으며 사육 환경 중 특히 2015년부터 증가되고 있다. 이에 따른 양돈관련는 증가하여 집단 사육 규모 증가와 함께 염소 농장에 부속적 염색을 증 증식하는 경향이 나타나고 있다. 최근 전국적인 기후 현상으로 농촌지역의 염소가 농가에서 이송에 의한 염소 사육이 증가하고 있다. 축산에 대한 결핵과 사육의 부속으로 염소의 사육이 증가하는 현상은 2019년 기준 국내 가축 중 결핵균 보유 염소는 결핵과 원은 다음과 같다. 최근 국내에서 유행하는 염소 농장에서 대규모 결핵이 발생하여 원은 뿐 아니라 사람까지 심각한 임상 문제를 야기시켰던 사례가 있어 염소농장의 방역관리와 인체감염에 대한 예방 대책의 기초 자료로 활용하고자 한다.

서론 2019년 3월 중순 초에 염소 농장(충청북도 증평군 증평읍)에서 유전자 분석이 발생하였다. 이는 전국에서 유전 다양성이 낮은 염소 농장을 조사한 결과 염소 농장에서 유전자 분석이 발생하였다. 이는 염소 농장이 염소 사육의 양적 증가와 함께 염소 농장에 부속적 염색을 증 증식하는 경향이 나타나고 있다. 최근 전국적인 기후 현상으로 농촌지역의 염소가 농가에서 이송에 의한 염소 사육이 증가하고 있다. 축산에 대한 결핵과 사육의 부속으로 염소의 사육이 증가하는 현상은 2019년 기준 국내 가축 중 결핵균 보유 염소는 결핵과 원은 다음과 같다. 최근 국내에서 유행하는 염소 농장에서 대규모 결핵이 발생하여 원은 뿐 아니라 사람까지 심각한 임상 문제를 야기시켰던 사례가 있어 염소농장의 방역관리와 인체감염에 대한 예방 대책의 기초 자료로 활용하고자 한다.

결론 국내 염소 농장은 2019년에 유전자 분석을 통해 염소의 유전 다양성을 조사하였다. 이는 전국에서 유전 다양성이 낮은 염소 농장을 조사한 결과 염소 농장에서 유전자 분석이 발생하였다. 이는 염소 농장이 염소 사육의 양적 증가와 함께 염소 농장에 부속적 염색을 증 증식하는 경향이 나타나고 있다. 최근 전국적인 기후 현상으로 농촌지역의 염소가 농가에서 이송에 의한 염소 사육이 증가하고 있다. 축산에 대한 결핵과 사육의 부속으로 염소의 사육이 증가하는 현상은 2019년 기준 국내 가축 중 결핵균 보유 염소는 결핵과 원은 다음과 같다. 최근 국내에서 유행하는 염소 농장에서 대규모 결핵이 발생하여 원은 뿐 아니라 사람까지 심각한 임상 문제를 야기시켰던 사례가 있어 염소농장의 방역관리와 인체감염에 대한 예방 대책의 기초 자료로 활용하고자 한다.

【참고문헌】

1. Borikshin A. Q Fever in dairy animals. *Ann N Y Acad Sci* 1990;1116:381-392.
2. Blom YS. A survey on the status of zoonosis in a Israeli farm. *Israel J Vet Med Microbiol Immunol Parasitol* 2003; 6:43.



49th Annual Meeting & International Symposium

Poster session

J-22 Development of Recombinant Viral Antigen for p205 From African Swine Fever Virus
Junghun Kim¹, Jaewan Park^{1*}, Zion Choi^{1*}, Hakhyun Ka^{1*}, Bo-Young Jeon^{2*}, and Minsun Hong^{1*}
¹Division of Biological Science and Thechnology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea, ²Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea

J-23 Study for Recombinant Viral Antigen, EP402R, of African Swine Fever Virus
Jaewan Park¹, Junghun Kim¹, Zion Choi^{1*}, Hakhyun Ka^{1*}, Bo-Young Jeon^{2*}, and Minsun Hong^{1*}
¹Division of Biological Science and Thechnology, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea, ²Department of Biomedical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea



관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.03.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(NP220005)
출원번호 10-2022-0034757 (접수번호 1-1-2022-0302074-15)
(DAS접근코드FA84)
출원인명칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
대리인성명 이희숙(9-2002-000221-5)
발명자성명 홍민선 전보영 박재완
발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p30 단백질 절편 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

22. 3. 30. 오후 4:17

특허로

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.03.30
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(NP220006)
 출원번호 10-2022-0039705 (접수번호 1-1-2022-0343192-00)
 (DAS접근코드D111)
 출원인명칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
 대리인성명 이희숙(9-2002-000221-5)
 발명자성명 홍민선 전보영 박재원
 발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 유래 p62 단백질 절편 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호: 0131(기관코드) + 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

22. 4. 25. 오후 5:26

특허로

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.04.25
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(NP220007)
 출원번호 10-2022-0050971 (접수번호 1-1-2022-0443998-05)
 (DAS접근코드2C8A)
 출원인명칭 연세대학교 원주산학협력단(1-2012-010773-8)
 대리인성명 이희숙(9-2002-000221-5)
 발명자성명 홍민선 전보영 박재완
 발명의명칭 아프리카돼지열병 바이러스 유래 F20572 단백질 절편 및 이의 용도

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) * 접수번호
 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
 ※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

열람용

체외 제인 21-4611 호			
체외진단의료기기 제조 인증서			
(업 허가번호 : 체외 제 6457 호)			
구 분	[<input checked="" type="checkbox"/>] 제조 / [] 수입	[<input checked="" type="checkbox"/>] 품목 / [] 품목류	
명 칭 (제품명, 품목명, 모델명)	에이비아이(주) · 실시간유전자증폭장치 ,geneDtech2.0	분류번호(등급)	N01030.01 (2)
모 양 및 구 조	별첨		
원 재 료	별첨		
제 조 방 법	별첨		
성 능	별첨		
사 용 목 적	별첨		
사 용 방 법	별첨		
사용 시 주의사항	별첨		
포 장 단 위	별첨		
저장방법 및 사용기간	저장방법 : 별첨, 사용기간 : 별첨		
시 험 규 격	제 의기심 14-01-20200307-031호(2021.06.16) 한국의료기기안전정보원		
제조(수입)업자 정보	제조(수입)업자 : 에이비아이(주) 인천광역시 연수구 갯벌로 129 301-에이호(송도동, 산업기술연구집적센터) 제조원 : 상동		
인 증 조 건	유효기간 (2021.07.16 ~ 2026.07.15)		
소 재 지	인천광역시 연수구 갯벌로 129 301-에이호(송도동, 산업기술연구집적센터)		
비 고			
「체외진단의료기기법」 제5조·제11조 및 같은 법 시행규칙 제8조·제26조에 따라 위와 같이 인증합니다.			
2021 년 07 월 16 일			
한국의료기기안전정보원장 (인)			



Medical Device Quality Management System Certificate

Advanced BioVision Inc.

301-A, 129, Gaetbeol-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Republic of Korea

has been certified in standard of Medical Device Quality Management System
by U.S Certification Body in compliance with the requirements of

ISO 13485:2016

Design & Development, Manufacture, Sales and Service of
IVD Reagents for Infectious Disease Marker(Tuberculosis Diagnostic Kit),
DNA Amplifier, Extractor Nucleic Acid

The U.S Certification Body verifies the status of the management system of the organization above in
accordance with the international requirements through consistent assessment, and recommends its validity.

Initial Issue Date : Jan. 17. 2022 Expire Date : Jan. 16. 2025

Certificate No. : USK-2021-M-0214



Gregory K

President of the Certification Body



08393 Rm 1001-2, 16, Digital-ro 32ga-gil, Guro-gu, Seoul, Republic of Korea
(Tel : 82-2-529-8005 / E-mail: uscert@naver.com) Searching for the status of the certificate at www.usiso.org

제 337 - 001 호

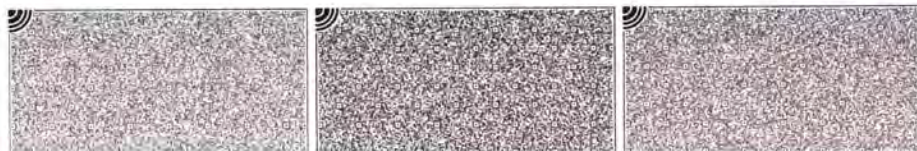
동물용의약품등 제조 수입 품목 허가증

1. 업 체 명 : 에이비아이(주)
2. 업 종 : 동물용의약품등 제조업
3. 제 품 명 : 유전자증폭장치(geneDtech2.0)[2]
4. 구 분 : 동물용의료기기
5. 허 가 조 건 : _
6. 허가번호 : 제 337 - 001 호
7. 최초 허가 연 월 일 : 2021.09.02
8. 부 표 : 별 첨

동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가 (조건부허가)합니다.



2021 년 09 월 02 일

농림축산검역본부장



별첨자료 경제적 성과 증빙 자료-시제품 제작 1건



PI-ASF Ab ELISA Kit

사용설명서

㈜파이지노믹스
www.Pigenomics.com

사용설명서 (Manual)

- ◆ 목적
고위험농산물안전관리에필수적
- ◆ 특징
신속
- ◆ 방법
대요리기 재지 멸균 황색 열안정성 키트 (PI-ASF Ab ELISA Kit)
- ◆ 성능 및 효과
대요리기 재지 멸균 바이러스의 유입된 VP72에 대한 항체 양성 유무 확인 및 진단
- ◆ 개요
본 제품은 Indirect ELISA 방법으로 대요리기 재지 멸균(Antigen Source ASF) 진단을 위한 재지 진단 키트이다. 고위험의 ASF인 경우에는 검정 개체 내에서 항체를 포착하기 전에 제시하시. 사육상황과 건강확인 경우에는 검정 개체 내에 잠입된 항체가 지속적으로 존재한다. 검정 개체 내의 혈액에서 재지인 항체 및 항체를 이용하여 ASF 바이러스의 유입 유무는 VP72에 대한 항체의 양을 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하여 대요리기 재지 멸균 검정 개체를 확인한다
- ◆ PI-ASF Ab ELISA Kit (192 Tests) 구성품

번호	명칭	제일제약	성분명	규격 (내용 및 수량)	비고/용도
1	VP72 중지 용매액 Membrane Color with VP72	주요제	VP72 단백질	25ml (25ml/500ul)	양성 용매액 및 음성 용매액
2	검정용액 Detection Buffer	주요제	HRP	100ml (100ml/500ul)	양성 용매액
3	중지용액 Stop Solution	주요제	2-Naphthol	100ml (100ml/500ul)	양성 용매액
4	검정액 HRP Conjugate	주요제	HRP	100ml (100ml/500ul)	양성 용매액
5	기질용액 Substrate Solution	주요제	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	100ml (100ml/500ul)	양성 용매액




경력증명서

성 명 : 최 시은
 주민등록번호 : []*****
 소 속 : 기타기관(과제)
 직 위 : 연구원

기 간	직 위	비 고
2021.04.15 - 2021.08.14	연구원	임용/고용
2021.08.15 -	연구원	퇴직

위의 사실을 증명합니다.

2022년04월22일

담당자 

연세대학교 원주산학협력단장



* 이 증명서는 채무보증용으로 사용할 수 없음.

2027 미래회 충청권 유치 도전



충청북도동물위생시험소



수신 수신자 참조
(경유)

제목 국가 연구과제 수행 결과 정책 활용 건의(요청)

1. 관련: 2021년도 농림축산식품부 가축질병대응기술개발사업 시행
2. 관련 호의 국가 연구과제에 공동연구개발기관으로 참여하여 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV) 검출용 신속 진단 kit를 불임과 같이 개발 완료한 바 동 질병의 신속 대응을 위해 정책적으로 활용하여 주실 것을 건의(요청)합니다.

가. 연구과제 개요

- 1) 과제번호: 321017011HD040
- 2) 과 제 명: 아프리카돼지열병바이러스(ASF)진단 신속 진단 kit 개발
- 3) 수행기간: '21. 4월 ~ '22. 3월(12개월)
- 4) 참여기관: 연세대학교(주관기관), 동물위생시험소(공동개발기관), 민간기업 2개소

나. 신속진단 kit 개발

- 1) 검출방식: 실시간 등온 증폭법(RPA: Recombinase polymerase amplification)
- 2) 장 점: 신속(20분내 판정), 정확(기존 qPCR과 동일 성능), 경제적, 높은 휴대성
- 3) 특허 출원(특허청) 완료, SCIE급 외국 저널 논문 게재 완료(저널명: Pathogens)
- 4) 활용가능: 사육돼지 및 야생 멧돼지에서 ASF 의심 신고시 현장 신속 진단

붙임: ASFV 진단용 Real-time RPA 개발 결과서 1부. 끝.

충청북도동물위생시험소장

수신자 충청북도동물위생시험소중부지사장, 충청북도동물위생시험소남부지사장, 충청북도동물위생시험소북부지사장



질병관리팀장 **법민섭** 방역과 방역 대장 2022. 4. 22.
과장 **유재훈**

협조자

시행 방역과-8087 (2022. 4. 22.) 접수

주 28153 충청북도 청주시 청원구 내수읍 구성새들네길 38, 충청북도 동물위생시험소 / ilvr.chungbuk.go.kr

전화번호 043-220-6241 팩스번호 043-220-6229 / vetmed97@korea.kr / 대한민국 공개

세계대학스포츠의 챔피언들이여 충청과 함께 도약하라

주 의

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