



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0128167
(43) 공개일자 2022년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 2561/113 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2021-0032872

(22) 출원일자 2021년03월12일
심사청구일자 2021년03월12일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김동민

광주광역시 남구 봉선중앙로 6, 101동 402호 (봉선동)

이유미

광주광역시 남구 서문대로663번안길 2, 102동 1208호 (진월동, 호반아파트)

김춘미

광주광역시 동구 계림로30번길 15, 204동 1201호 (계림동, 푸른길 두산위브)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

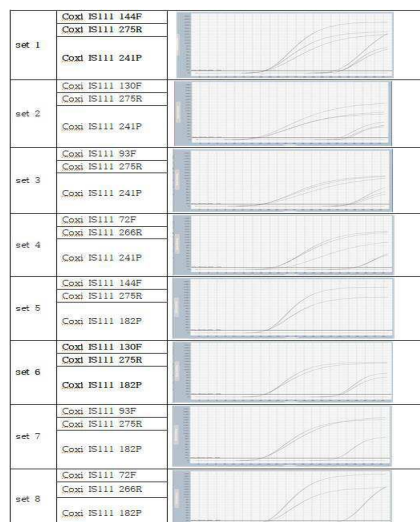
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **큐열 진단용 조성물 및 실시간 PCR을 이용한 큐열 진단방법**

(57) 요약

본 발명은 큐열 진단용 조성물 및 실시간 PCR을 이용한 큐열 진단방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하는 큐열 균 검출용 조성물, 상기 검출용 조성물을 포함하는 큐열 진단용 키트 및 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 큐열 균 검출용 조성물 및 이를 이용한 큐열 진단방법은 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 기존 알려진 검출 방법에 비해 정확도 및 민감도가 우수하므로 PCR을 통한 간단한 방법으로 큐열을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 세트;를 포함하는,

큐열 균 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 큐열 균 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 큐열 균 검출용 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는, 큐열 진단용 키트.

청구항 5

- (1) 큐열이 의심되는 환자의 분리된 시료에서 핵산을 분리하는 단계;
- (2) 상기 분리된 핵산을 주형으로 하고, 제4항의 키트를 사용하여 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및
- (3) 상기 단계 (2)를 통해 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는,

큐열 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 (1)의 시료는 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변인 것을 특징으로 하는, 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 PCR 증폭은 컨벤셔널 중합효소 연쇄반응(C-PCR:conventional PCR), 네스티드 중합효소 연쇄반응(N-PCR:nested PCR), 다중 중합효소 연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응 및 역

전사 중합효소연쇄반응으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 큐열 진단용 조성물 및 실시간 PCR을 이용한 큐열 진단방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 큐열은 *Coxiella burnetii*(*C. burnetii*) 세균 감염에 의해 발생하는 인수공통감염병으로 주로는 비말 흡입에 의해 사람에게 전파되는 것으로 알려져 있다. 국내에서는 2006년부터 제4군 법정감염병으로 지정되었고, 매년 10명 내외의 환자가 신고 되었으나 2015년 이후 급격한 증가세를 보이고 있다.

[0003] 급성 큐열은 발열, 오한, 두통과 같은 비특이적인 증상만을 나타내기 때문에 임상 의들이 질병의 급성기에 큐열을 의심하는 경우가 드물며, 진단은 혈청학적인 방법으로 진행되기 때문에 정확한 진단을 위해서는 환자의 급성기와 회복기 혈청이 필요하다.

[0004] 급성 큐열 환자의 진단에 가장 많이 사용되고 있는 간접면역형광법(indirect immunofluorescence assay, IFA)의 경우, 증상 발생 첫 주 및 둘째 주 진단에 대한 민감도가 각각 7%, 26%로 매우 낮은 실정이며, 항체 음성 큐열 환자에서 큐열 특이 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)은 26~89%로 보고되고 있다.

[0005] 큐열 진단을 위한 혈청학적 진단방법은 증상 발생 후 7-15일 이후에 검사가 시행되어야 항체 보유 여부를 확인할 수 있으며, 급성 혹은 과거 감염 여부를 구분하기 위해서는 급성기와 회복기 혈청모두를 확인해야 하므로 최종 진단은 환자가 큐열에서 회복된 이후에야 가능하다는 문제가 있다.

[0006] 또한, 급성 큐열은 2-3주의 잠복기를 거쳐 비특이적인 발열과 함께 간염이나 폐렴이 동반될 수 있는 위험성이 있고, 1% 이하에서는 심근염, 심장막염, 뇌염 등이 나타날 수 있지만 빠른 진단과 doxycycline 계열의 항생제로 효과적으로 치료할 수 있다.

[0007] 만성 큐열은 급성 큐열 환자 중에서 1-5%에서 발생하며 면역저하자, 임산부, 판막질환, 혈관 질환 및 인공고관절을 갖고 있는 사람에서 주로 나타난다. 심내막염, 혈관염, 골관절염 형태로 나타나는 만성 큐열은 약 2년 가량의 항생제 치료 및 수술적 치료가 필요할 수 있고, 추적 관찰시 최대 50%의 사망률을 나타낼 수 있으므로 조기 발견 및 적절한 치료가 매우 중요하다. 또한, 임신 기간 동안의 *C. burnetii* 감염은 대부분 무증상이나 산모와 태아에게 합병증을 초래할 수 있으며 태아에게는 자연유산, 사산, 조산 및 자궁내성장지연을 일으키고 산모의 경우 만성 큐열로 진행되는 경우가 많다. 임산부에서 급성 큐열로 진단되어 적절한 항생제 치료를 받는 경우 태아에 대한 합병증을 줄일 수 있으나 치료받지 않은 임산부의 경우 최대 81%에서 임신과 관련된 합병증이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 국내의 경우, 큐열을 진단하는 방법으로 간접면역형광법이 주로 사용되고 있고, *C. burnetii* 균의 배양 검사가 시행되고 있으나, *C. burnetii* 배양은 시간과 노력이 많이 들고 biosafety level 3 시설을 필요로 하는 위험한 일이기 때문에 일반적으로 권장되지 않는 방법이다.

[0009] 따라서 큐열을 신속하게 높은 정확도로 편리하게 진단할 수 있는 새로운 진단방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2200940

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에 본 발명자들은 *Coxiella burnetii*의 IS1111을 타겟으로 하는 큐열 진단용 프라이머 및 프로브를 고안하였

고, 이를 이용할 경우, 기존 검사법보다 검출 민감도 및 특이도를 향상시켜 매우 신속하고 정확하게 큐열의 조기진단이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하는, 큐열 균 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 큐열 균 검출용 조성물을 포함하는 큐열 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 큐열 진단용 키트를 이용한 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하는, 큐열 균 검출용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 본 발명의 큐열 균 검출용 조성물을 포함하는, 큐열 진단용 키트를 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은, (1) 큐열이 의심되는 환자의 분리된 시료에서 핵산을 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 핵산을 주형으로 하고, 본 발명의 큐열 진단 키트를 사용하여 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (3) 상기 단계 (2)를 통해 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계 (1)의 시료는 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자는 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR 증폭은 컨벤셔널 중합효소 연쇄반응(C-PCR:conventional PCR), 네스티드 중합효소 연쇄반응(N-PCR:nested PCR), 다중 중합효소 연쇄반응, 실시간 중합효소 연쇄반응, 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응 및 역전사 중합효소연쇄반응으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 큐열 검출용 조성물 및 이를 이용한 큐열 진단방법은 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 기존 알려진 검출 방법에 비해 정확도 및 민감도가 우수하므로 실시간 PCR을 통한 간단한 방법으로 큐열을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 고안한 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자 검출용 프라이머 및 프로브들을 이용한 PCR 수행으로 검출 민감도를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 큐열(Q fever)을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 새로운 큐열 균 검출용 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[0026] 본 발명자들은 큐열의 발병 원인이 되는 큐열 균의 감염에 대한 정확하고 신속한 진단 및 치료를 위해, 큐열 균을 정확하고 신속하게 검출할 수 있는 방법을 연구하던 중, 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 큐열 균 검출을 위한 새로운 타겟 마커로 사용할 수 있음을 확인하였고, 상기 IS1111 유전자에

특이적으로 결합하여 큐열 균의 감염여부를 높은 민감도와 정확도로 검출할 수 있는 프라이머 및 프로브를 발굴하였다.

- [0027] 한편 앞서 종래기술에서도 기술한 바와 같이, 큐열 진단을 위한 종래 방법은 간접면역형광법이 사용되고 있으나, 증상 발생의 첫째 주 및 둘째 주에 대한 민감도는 각각 7% 및 26%로 매우 낮아 조기 진단이 어려운 문제가 있고, 혈청학적 진단 방법은 급성기와 회복기 혈청을 모두 확인해야 하기에 최종적인 진단은 환자가 큐열에서 회복된 이후에야 가능하므로, 실질적으로 조기 진단이 불가능한 상황이다.
- [0028] 이러한 점에서 본 발명은 큐열을 높은 민감도와 특이도로 조기에 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 큐열 균 검출용 조성물을 제공할 수 있어, 큐열의 조기 진단이 가능하고, 다른 질환과도 구별이 가능하며 PCR의 간단한 방법으로 편리하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 종래 방법에 비해서도 정확도가 우수한 새로운 큐열 진단방법을 제공할 수 있는 특징이 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에서는, 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 대한 다양한 서열정보를 바탕으로, 다양한 IS1111 유전자의 서열에서 서열 보존영역을 분석하여, 상기 보존영역을 검출할 수 있는 다양한 염기서열로 구성된 프라이머 및 프로브들을 제작하였다. 각기 다른 염기서열로 구성된 많은 프라이머 및 프로브들 중에서 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 대하여 민감도 및 특이도가 월등히 우수한 프라이머 및 프로브를 발굴하였다.
- [0030] 본 발명에서 발굴된 상기 프라이머 및 프로브를 포함하는 큐열 균 검출용 세트는, Coxi IS1111 144F 프라이머(5'-GTGGGGTAAAGTGATCTAC-3'; 서열번호 1), Coxi IS1111 275R 프라이머(5'-CCCATAAACGTCCGATAC-3'; 서열번호 2) 및 Coxi IS1111 241P 프로브(5'-CACACGCTTCCATCACCACG-3'; 서열번호 3)일 수 있고, 또 다른 세트로는, Coxi IS1111 130F 프라이머(5'-TGTGGAATTGATGAGTGG-3'; 서열번호 4), Coxi IS1111 275R 프라이머(5'-CCCATAAACGTCCGATAC-3'; 서열번호 2) 및 Coxi IS1111 182P 프로브(5'-CTCAGTATGTATCCACCGTAGCCAG-3'; 서열번호 9)일 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명의 실험에 의하면, 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 서열을 토대로 디자인한 많은 프라이머 및 프로브가 상기 유전자를 정확하게 증폭할 수 있는 것이 아님을 확인하였고, 단지 서열번호 1과 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 이용한 세트; 및 서열번호 4와 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 이용한 세트를 사용할 경우에만 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 특이적으로 높은 민감도로 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하는, 큐열 균 검출용 조성물을 제공함에 특징이 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 프라이머 및 프로브는 큐열 균, 바람직하게는 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자는 서열번호 10으로 이루어진 염기서열을 갖는다.
- [0034] 나아가 본 발명의 다른 일실시예에서는, 종래 알려진 큐열 균 검출용 프라이머와 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하여 PCR 방법을 통해, 큐열 균에 대한 검출효과를 비교 분석하였는데, 종래 프라이머를 이용한 PCR 방법에 비해 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 경우가 더 우수한 민감도 및 특이도를 보인다는 것을 확인하였다.
- [0035] 뿐만 아니라, 본 발명의 일실시예에서는 큐열이 아닌 다른 질환으로 진단 받은 환자의 검체를 대상으로 본 발명에 따른 검출 키트를 사용하여 PCR 분석을 수행하였는데, 분석 결과, 본 발명의 검출 키트는 다른 질환의 환자로부터 수득한 검체에서는 아무런 반응산물이 확인되지 않은 반면, 큐열로 진단받은 환자의 시료에서만 반응산물이 검출되어 큐열 질환을 선택적으로 다른 질환들과 구별하여 진단할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0036] 따라서 본 발명에 따른 상기 큐열 균 검출용 조성물은 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 특이적으로 높은 민감도와 정확도로 검출할 수 있는 본 발명의 프라이머 및 프로브를 포함하는 조성물로서, 분석하고자 하는 시료에 큐열 균이 존재하는지의 여부를 분석할 수 있을 뿐만 아니라 큐열의 진단을 위한 진단용 조성물로도 사용될 수 있다.
- [0037] 그러므로 본 발명은 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는

폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하는, 큐열 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

- [0038] 상기 본 발명의 검출용 또는 진단용 조성물은 상기에서 언급한 본 발명에 따른 프라이머 쌍 및 프로브 이외에 중합효소 연쇄반응(PCR)에 사용할 수 있는 성분, 예를 들면 반응용 완충용액, dNTP, Mg^{2+} 이온, DNA 중합효소를 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 반응용 완충용액은 1 ~ 10 mM TrisHCl, 10 ~ 40 mM KCl(pH9.0)을 사용할 수 있고, 상기 dNTP는 dATP, dTTP, dGTP, dCTP 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0040] 또한 상기 조성물은 실험상의 편의, 안정화 및 반응성 향상을 위해 안정화제 및/또는 비반응성 염료 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 비반응성 염료 물질이란 중합효소 연쇄반응에 영향을 미치지 않는 물질로부터 선택되어야 하며, 중합효소 연쇄반응 산물을 이용한 분석이나 식별을 위해 사용되는 것을 목적으로 한다. 이러한 조건을 만족시키는 물질로는 로다민, 탐라, 락스, 브로모페놀 블루, 크실렌 시아놀, 브로모크레졸 레드, 크레졸 레드 등의 수용성 염료로 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 조성물은 액상 형태로 제공될 수 있으며, 안정성, 보관의 간편성 및 장기 보관성을 증가시키기 위하여 건조된 상태인 것이 바람직하다. 상기 건조는 일반적인 상온건조, 가온건조, 동결건조, 감압건조와 같은 공지의 건조 방법에 의해 수행될 수 있으며, 조성물의 성분이 손실되지 않는 한, 임의의 건조 방법은 모두 사용 가능하다. 상기와 같은 건조 방법은 사용되는 효소의 종류 및 양에 따라 상이하게 적용될 수 있다.
- [0043] 상기 조성물은 한 반응 튜브 내에 혼합시킨 후 동결하거나 건조시켜 안정화된 상태로 제조하여 사용하게 됨으로써, 중합효소 연쇄반응 동안에 별도의 혼합과정이 필요하지 않으므로 반응 중 혼합으로 인한 오류를 방지할 수 있으며, 안정성, 반응성 및 보관성을 향상시킬 수 있다.
- [0044] 상기의 조성물은 프라이머 쌍 및 프로브를 제외한 나머지 성분인 반응용 완충용액, dNTP, Mg^{2+} 이온, DNA 중합효소들이 이미 함유된 시중에 판매되는 제품을 사용할 수 있다.
- [0045] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 조성물을 포함하는, 큐열 진단용 키트를 제공할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 상기 진단용 키트에는 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트;를 포함하고 있어 큐열을 높은 정확도로 신속하게 조기에 진단할 수 있다.
- [0047] 상기 진단은 분석하고자 하는 검체 시료에 큐열 균이 포함되어 있는지 여부를 판별하기 위해 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)을 사용할 수 있으며, 상기 중합효소연쇄반응은 일반적인 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 및 실시간 중합효소연쇄반응 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 등을 포함한다. 본 발명의 일실시예에서는 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다.
- [0048] 본 발명의 진단 키트는 본 발명의 프라이머쌍 및 프로브 이외에도, 역전사효소, 중합효소, 중합효소연쇄반응을 위한 주형 DNA(template DNA)로서 상보적 DNA(cDNA), 및 버퍼 등의 반응 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 진단 키트는 일반적인 중합효소연쇄반응 또는 실시간 중합효소연쇄반응 등에 사용될 수 있는데, 이 경우 분석하고자 하는 시료로부터 분리된 큐열 균의 DNA 유전체를 대상으로 PCR 방법을 수행할 수 있고, 또는 큐열 균의 RNA 유전체로부터 역전사효소 (reverse transcriptase)의 작용을 통한 역전사 (reverse transcription) 반응을 별도로 수행하여 상보적 DNA(cDNA)를 합성하고 이를 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용할 수 있다.
- [0050] 중합효소연쇄반응의 결과물은 아가로스 겔 전기영동 (agarose gel electrophoresis) 또는 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis) 등의 방법으로 분리할 수 있으며, 사용된 프라이머쌍 및 프로브에 의해 중합된 DNA에 해당하는 길이를 갖는 DNA의 존재를 확인하여 큐열을 진단할 수 있다.
- [0051] 또한 본 발명에서는 큐열 균의 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 서열번호 3 또는 서열번호 9의 프로브(probe)를 사용하였는데, 상기 프로브는 각 말단에 형광물질 및 소광체(quencher)를 결합시켜 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 프로브의 5말단에는 형광물질이 결합되고 3말단에는

소광체가 결합된 것일 수 있으며, 프로브의 5말단에는 적색, 녹색, 청색 등 특정 파장을 방출하는 형광물질이 결합되고 3말단에는 블랙홀 소광체(black hole quencher, BHQ)가 결합될 수 있다. 형광물질과 소광체가 프로브에 결합되어 있는 상태에서는 소광체가 형광물질이 방출하는 빛을 흡수하기 때문에 형광 신호가 검출되지 않는다. 반면, DNA의 합성 및 신장 과정에서 DNA 중합효소의 exonuclease activity에 의해 결합되어 있던 형광물질이 분리되면 형광신호를 검출할 수 있다. 중합효소연쇄반응이 진행되는 동안, 이러한 형광신호를 실시간으로 측정할 수 있으며, 증가한 형광신호를 바탕으로 바이러스 유전자 존재 유무를 판별할 수 있다. 이러한 프로브의 사용은 실시간 중합효소연쇄반응에 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 나아가 본 발명은 큐열 균의 감염 진단방법을 제공할 수 있으며, 큐열의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[0053] 바람직하게 상기 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법은, (1) 큐열이 의심되는 환자의 분리된 시료에서 핵산을 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 핵산을 주형으로 하고, 본 발명의 진단 키트를 사용하여 실시간 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (3) 상기 단계 (2)를 통해 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 확인하는 단계;를 포함한다.

[0054] 또한, 추가로 상기 시료에서 핵산으로 RNA를 분리할 경우, 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA를 주형으로 본 발명의 진단 키트를 사용하여 실시간 PCR 증폭을 수행할 수 있다.

[0055] 상기 시료는 이에 제한되지는 않으나, 포유동물로부터 수득한 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변일 수 있다.

[0056] 또한 상기 방법에서 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자의 확인은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 방법을 통해 수행할 수 있다.

[0057] 이상 본 발명에서 고안한 큐열 균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자에 특이적으로 결합하는 서열번호 1의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트; 또는 서열번호 4의 프라이머이며, 서열번호 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브를 포함하는 폴리뉴클레오티드 세트를 이용할 경우, 큐열 균을 높은 민감도와 정확도로 신속하게 검출할 수 있다는 장점이 있으며, 하기 실시예에서 실제 환자의 시료를 대상으로 분석한 결과, 80% 이상의 높은 민감도와 100%의 특이도로 진단이 가능함을 확인하였고, 매우 빠른 시간에(1시간 이내) 높은 정확도로 진단이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0058] 그러므로 본 발명에서 고안한 큐열 균 검출용 조성물을 이용한 큐열 진단 방법 및 큐열 진단을 위한 정보 제공 방법은 큐열 균을 초기에 신속하고 정확하게 진단할 수 있으며, 실시간으로 큐열 균의 검출이 가능하기에 약물 투여에 따른 증상의 개선정도를 모니터링 할 수 있고, 나아가 타질환과 큐열 질병을 높은 특이도로 구별할 수 있어 보다 정확한 치료법의 선택에도 유용하게 사용할 수 있다.

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] <실시예 1>

[0063] 큐열균 검출을 위한 타겟 유전자 선별 및 프라이머와 프로브 제작

[0064] 본 발명자들은 큐열 진단을 위한 새로운 진단방법을 개발하기 위해, 큐열균인 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)의 IS1111 유전자를 타겟으로 하는 검출용 프라이머 및 프로브를 제작하였다.

[0065] 먼저 타겟 부위의 선별을 위해, *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자에 대한 서열정보를 수집하였고, 서열 분석을 통해 보존된 영역을 검출할 수 있는 프라이머와 프로브를 디자인하였다.

[0066] 하기 표 1은 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자에 대한 다양한 서열정보를 나타낸 것이다.

표 1

*Coxiella burnetii*의 IS1111 서열정보

GenBank Accession no.	sp.	strain
AE016828	<i>Coxiella burnetii</i>	RSA 493
CP000733	<i>Coxiella burnetii</i>	Dugway 5J108-111
CP000890	<i>Coxiella burnetii</i>	RSA 331
CP001019	<i>Coxiella burnetii</i>	CbuG_Q212
CP001020	<i>Coxiella burnetii</i>	CbuK_Q154
CP007555	<i>Coxiella burnetii</i>	Namibia
CP013667	<i>Coxiella burnetii</i>	3262
CP018150	<i>Coxiella burnetii</i>	MSU Goat Q177
HG825990	<i>Coxiella burnetii</i>	Cb175 Guyana
KT381466	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC13 WGPS 7
KT381467	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC13 WGPS 21-22-23
KT391013	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC286
KT391014	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC282
KT391015	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC477
KT391016	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC13
KT391017	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC477
KT391018	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC286
KT391019	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC282
KT391020	<i>Coxiella burnetii</i>	EVC13
KT954146	<i>Coxiella burnetii</i>	AuQ31 MLVA
LK937696	<i>Coxiella burnetii</i>	Z3055
M80806	<i>Coxiella burnetii</i>	

[0067]

[0068]

상기 표 1과 같이 다양한 *Coxiella burnetii*의 IS1111 서열에 대하여 보존적인 서열을 탐색하였고, 해당 영역을 타겟팅하여 증폭할 수 있을 것으로 예상되는 하기 표 2의 다양한 프라이머 및 프로브를 디자인하였다.

표 2

Coxiella burnetii 검출을 위한 고안된 프라이머 및 프로브

세트 No.	Name	Sequence	길이	서열번호	반응산물 (bp)
1	Coxi IS1111 144F	GTGGGGTAAAGTGATCTAC	19	1	132
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 241P	CACACGCTTCCATCACCACG	18	3	
2	Coxi IS1111 130F	TGTGGAATTGATGAGTGG	18	4	146
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 241P	CACACGCTTCCATCACCACG	20	3	
3	Coxi IS1111 93F	ACTGGGTGTTGATATTGC	18	5	183
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 241P	CACACGCTTCCATCACCACG	18	3	
4	Coxi IS1111 72F	GTCCATGAAAGATATTAAAATACTG	25	6	195
	Coxi IS1111 266R	GTCCGATACCAATGGTTC	18	7	
	Coxi IS1111 241P	CACACGCTTCCATCACCACG	18	3	
5	Coxi IS1111 144F	GTGGGGTAAAGTGATCTAC	19	8	132
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 182P	CTCAGTATGTATCCACCGTAGCCAG	25	9	
6	Coxi IS1111 130F	TGTGGAATTGATGAGTGG	18	4	146
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 182P	CTCAGTATGTATCCACCGTAGCCAG	20	9	
7	Coxi IS1111 93F	ACTGGGTGTTGATATTGC	18	5	183
	Coxi IS1111 275R	CCCATAAACGTCCGATAC	18	2	
	Coxi IS1111 182P	CTCAGTATGTATCCACCGTAGCCAG	20	9	
8	Coxi IS1111 72F	GTCCATGAAAGATATTAAAATACTG	25	6	195
	Coxi IS1111 266R	GTCCGATACCAATGGTTC	18	7	
	Coxi IS1111 182P	CTCAGTATGTATCCACCGTAGCCAG	20	9	

[0069]

[0071] <실시예 2>

[0072] **큐열균 검출을 위한 최적의 프라이머와 프로브 선별**

[0073] 상기 실시예 1에서 디자인한 표 2의 *Coxiella burnetii*의 IS1111 타겟 유전자를 검출을 위한 프라이머 및 프로브 세트를 대상으로 큐열 양성 환자의 혈액을 대상으로 gradient PCR을 수행하여, 민감도 검사를 수행하였다.

표 3

본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 gradient PCR을 통한

IS1111 타겟 유전자의 검출결과

프라이머 및 프로브 세트		Sample Name	57℃	59℃	61℃
set 1	Coxi IS1111 144F	2016-376 buffy	32.64	34.13	34.11
	Coxi IS1111 275R	pc	16.61	16.80	17.02
	Coxi IS1111 241P	nc	UD	UD	UD
set 2	Coxi IS1111 130F	2016-376 buffy	34.53	36.81	36.09
	Coxi IS1111 275R	pc	16.09	14.84	15.17
	Coxi IS1111 241P	nc	UD	UD	UD
set 3	Coxi IS1111 93F	2016-376 buffy	36.61	36.54	37.24
	Coxi IS1111 275R	pc	16.67	16.40	16.83
	Coxi IS1111 241P	nc	UD	UD	UD
set 4	Coxi IS1111 72F	2016-376 buffy	37.88	37.11	UD
	Coxi IS1111 266R	pc	19.14	18.45	21.28
	Coxi IS1111 241P	nc	UD	UD	UD
set 5	Coxi IS1111 144F	2016-376 buffy	UD	UD	
	Coxi IS1111 275R	pc	17.22	17.28	
	Coxi IS1111 182P	nc	UD	UD	
set 6	Coxi IS1111 130F	2016-376 buffy	33.9	34.5	
	Coxi IS1111 275R	pc	17.14	16.56	
	Coxi IS1111 182P	nc	UD	UD	
set 7	Coxi IS1111 93F	2016-376 buffy	33.76	UD	
	Coxi IS1111 275R	pc	16.56	16.27	
	Coxi IS1111 182P	nc	UD	UD	
set 8	Coxi IS1111 72F	2016-376 buffy	35	UD	
	Coxi IS1111 266R	pc	17.53	18.26	
	Coxi IS1111 182P	nc	UD	UD	

[0074]

[0076]

그 결과, 표 3 및 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 표 2의 프라이머 및 프로브 세트들 중에서, 세트 1(서열번호 1, 2의 프라이머 및 서열번호 3의 프로브) 및 세트 6(서열번호 4, 2의 프라이머 및 서열번호 9의 프로브)를 사용한 경우가 다른 프라이머 및 프로브를 사용한 군들에 비해 ct값이 더 빨리 확인되는 것으로 나타나, 세트 1 및 세트 6의 프라이머와 프로브가 쿼열균(*Coxiella burnetii*)을 높은 민감도로 신속하게 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 세트 1 및 세트 6의 프라이머와 프로브를 사용할 경우, 기존의 쿼열 검출 및 진단을 위한 검사 방법보다 시간과 비용을 모두 절약할 수 있으며, 검출 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0078]

<실시예 3>

[0079]

본 발명의 프라이머 및 프로브에 대한 쿼열 특이도 분석

[0081]

<3-1> 다양한 군들에 대한 검출 특이도 분석

[0082]

본 발명자들은 본 발명에서 고안한 쿼열 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브(상기 표 1의 세트 1)에 대한 쿼열 검출 특이도를 분석하기 위해, 하기 표 4와 같이 다양한 군들을 대상으로 검출 여부를 PCR 방법을 통해 분석하였다.

표 4

[0083]

다양한 균들을 대상으로 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 PCR 수행결과

	균주명	균주사항	IS1111 Q-PCR(design)
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (genomic species 2)	KCTC2508	UD
2	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i>	KCTC2358	UD
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	kctc2190	UD
4	<i>Enterobacter sakazakii</i>	kctc2949	UD
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	UD
6	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	UD
7	<i>Morganella morganell</i> subsp. <i>morganii</i>	KCCM11497	UD
8	<i>Salmonella enterica</i>	kctc12456	UD
9	<i>Serratia marcescens</i>	kctc12457	UD
10	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> (MRSA)	KCCM40510(ATCC33591)	UD
11	<i>Streptococcus pyogenes</i>	KCTC3208	UD
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	KCCM40417(ATCC13813)	UD
13	<i>Vibrio cholerae</i>	KCCM41626	UD
14	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM11965(ATCC17802)	UD
15	<i>Vibrio vulnificus</i>	KCTC 2962(ATCC27562)	UD
16	<i>Staphylococcus aureu</i>	ATCC 29213	UD
17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC1917(ATCC12228)	UD
18	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i>	KCTC3345(ATCC15305)	UD
19	<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 1925	UD
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC2242(ATCC13883)	UD
21	<i>Shigella sonnei</i>	KCTC2518(ATCC25931)	UD
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853(ATCC27853)	UD
23	<i>Staphylococcus mitis</i>	KCTC 3556(ATCC49456)	UD
24	<i>Staphylococcus sanguinis</i>	KCTC3284(ATCC10556)	UD
25	<i>Streptococcus sobrinus</i>	KCTC3288(ATCC33478)	UD
26	<i>O. tsutsugamushi</i> Boryong		UD
27	<i>O. tsutsugamushi</i> Karp		UD
28	<i>O. tsutsugamushi</i> Kato		UD
29	<i>O. tsutsugamushi</i> Gilliam		UD
30	<i>Rickettsia honei</i>		UD
31	<i>Rickettsia prowazekii</i>		UD
32	<i>Rickettsia rickettsii</i>		UD
33	<i>Ehrlichia chaffensis</i>		UD
34	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>		UD
35	<i>Rickettsia akari</i>		UD
36	<i>Bartonella henselae</i>		UD
37	<i>Bartonella elizabethae</i>		UD
38	<i>Bartonella quintana</i>		UD
39	<i>Anaplasma ovis</i>	ATCC® VR-1437™	UD
40	<i>Anaplasma marginale</i> Theiler	ATCC® VR-1436™	UD
41	<i>Ehrlichia canis</i> Ebony X+3 T75	PTA-5812	UD

[0085]

그 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법에서 고안된 *Coxiella burnetii*의 IS1111 타겟 유전자의 검출을 위한 검출용 키트(세트 1: 서열번호 1 및 2의 프라이머, 서열번호 3의 프로브)는 다른 균들에 대해서는 PCR 반응산물이 생성되지 않는 것으로 나타나, 오직 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자만을 검출할 수 있는

높은 특이도를 가진다는 것을 알 수 있었다.

<3-2> 타겟환 및 큐열 질환 환자 유래 혈액을 대상으로 한 본 발명의 큐열 진단키트의 특이도 분석

본 발명자들은 하기 표 5에 기재된 다양한 질환 및 큐열로 진단받은 환자들로부터 수득한 혈액 시료를 대상으로 상기 표 1에 기재된 세트 1~세트 4의 프라이머들을 이용한 conventional PCR 분석을 통해, 본 발명의 큐열 진단 키트에 대한 특이도 분석을 수행하였다.

표 5

NO.	LAB NO.	질환 종류	IS1111 C-PCR			
			진단키트 (set 1)	진단키트 (set 2)	진단키트 (set 3)	진단키트 (set 4)
			IS1111 144F	IS1111 130F	IS1111 93F	IS1111 72F
			IS1111 275R	IS1111 275R	IS1111 275R	IS1111 266R
1	2018-449	viral meningitis	0	0	0	0
2	2018-1196	tsutsugamushi	0	0	0	0
3	2019-039	OM	0	0	0	0
4	2019-050	1) Allegy 2) rashonleg	0	0	0	0
5	2019-101	FUO	0	0	0	0
6	2019-103	FUO	0	0	0	0
7	2019-111	1) FUO 2) unknown origin infection 3) r/o TBD 4) DM	0	0	0	0
8	2019-206	Q 열	1	0	0	0

그 결과, 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 큐열 진단키트(세트 1; 서열번호 1 및 2의 프라이머, 서열 번호 3의 프로브)를 이용한 경우, 다른 질환의 환자 유래 시료에서는 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자가 검출되지 않는 것으로 나타난 반면, 큐열로 진단받은 환자의 시료에 대해서만 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자가 검출되는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 이러한 결과는 세트 2, 세트 3 및 세트 4의 프라이머 및 프로브로 구성된 진단키트 사용 군에서는 나타나지 않았고, 오직 본 발명의 서열번호 1 및 2의 프라이머와 서열번호 3의 프로브로 구성된 세트 1의 진단키트를 사용한 군에서만 확인되었다.

따라서 본 발명에서 고안한 세트 1의 프라이머 및 프로브는 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자를 높은 특이도로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

<실시예 4>

큐열 환자로부터 분리된 검체를 이용한 PCR 검출 정확도 분석

<4-1> 민감도 분석

임상적으로 큐열이 의심되며 IS1111 타겟으로 한 nested PCR 양성으로 확인되었거나 또는 큐열 항체가 4배 이상 상승되어 큐열로 진단받은 환자로부터 검체를 채취하여 사용하였으며, 상기 검체는 2016-2019년까지 15명의 큐열 환자로부터 수득한 것을 사용하였다. 또한, 하기 표 6에 기재된 각 PCR 방법은 하기 표 7에 기재된 방법으로 수행하였다.

표 6

Lab no.	검체	E1111 N-PCR	phase1 IgG /IgM	phase2 IgG /IgM	16s N-PCR semi-1	16s N-PCR semi-2	Q-PCR E1111 _reference	Q-PCR E1111 본 발명의 검출키트(세트1)
2016-205	Buffy	양성	-	-	0	0	미검출	미검출
2016-376	Buffy	양성	-	-	양성	0	38.74	35.86
2017-289	WB	양성	-	-	0	0	40.71	40.33
2017-289	Buffy	양성	-	-	0	0	미검출	미검출
2017-370	Plasma	양성	-	-	양성	양성	36.98	33.24
2017-370	WB	양성	-	-	양성	양성	40.49	35.01
2017-370	Buffy	양성	-	-	양성	0	42.15	37.30
2017-512	Plasma	양성	-	-	0	0	36.80	32.21
2017-512	WB	양성	-	-	0	0	39.69	34.16
2017-512	Buffy	양성	-	-	0	0	42.03	35.09
2018-319	WB	양성	-	-	양성	양성	31.63	27.73
2018-319	Serum	양성	-	-	양성	양성	32.71	28.57
2018-793	WB	양성	-	-	0	0	미검출	36.26
2019-024	WB	양성	-	-	0	0	41.43	39.44
2019-032	WB	양성	-	-	0	0	40.66	36.24
2019-AJ03	WB	양성	-	-	0	0	미검출	37.63
2017-289	Plasma	0	1:16미만, 1:16미만 /1:16미만, 1:256	1:16미만, 1:16미만 /1:256, 1:2048	0	0	미검출	35.80
2017-578	WB	0	1:16미만, 1:128 /1:1024, 1:512	1:2048, 1:512 /1:2048 이상, 1:16미만	0	ND	미검출	37.95
2018-148	WB	0	1:16미만, 1:16미만 /1:2048, 1:1024	1:16미만, 1:16미만 /1:2048 이상, 1:512	0	ND	미검출	37.75
2018-525	WB	0	1:16미만, 1:16미만 /1:256, 1:16미만	1:16미만, 1:16미만 /1:1024, 1:16미만	0	ND	40.80	37.86
2018-716	WB	0	1:16미만, 1:16미만 /1:256, 1:2048 이상	1:16미만, 1:128 /1:512, 1:2048 1:1024	0	ND	37.86	37.68
2018-753	WB	0	1:16미만, 1:16미만 /1:2048, 1:512	1:16미만, 1:16미만 /1:2048, 1:16	0	ND	41.35	37.46

* ND: not done

WB: Whole blood

[0098]

표 7

PCR 방법

PCR	타겟 유전자	프라이머명	PCR 수행방법		
IS1111 N-PCR	htpAB-associated repetitive 유전자	IS1111 F1	Molecular Detection of <i>Coxiella burnetii</i> in the Sera of Patients with Q Fever Endocarditis or Vascular Infection. J Clin Microbiol. 2004 Nov;42(11):4919-24.		
		IS1111 R1			
		IS1111 F2			
		IS1111 R2			
IS1111 Q-PCR (본원발명)	IS1111a 유전자	Coxi IS1111 144F	온도	반응시간	반응 사이클 횟수
		Coxi IS1111 275R	95도	5분	1
		Cox IS1111 241P	95도	5초	45
			57도	5초	
			형광 스캔		
IS1111 Q-PCR reference	IS1111a 유전자	Cox-F	Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of <i>Coxiella burnetii</i> . BMC Microbiol. 2006; 6: 2.		
		Cox-R			
		Cox-TM			
16S N-PCR: semi-1, semi-2	16S rRNA	Cox16SF1	Detection and Genotyping of <i>Coxiella burnetii</i> in Pigs, South Korea, 2014-2015. Emerg Infect Dis. 2016 Dec; 22(12): 2192-2195.		
		Cox16SR2			
		Cox16SF2			
		Cox16SR1			

[0100]

[0101]

그 결과, 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브(세트 1)를 이용하여 실제 큐열 환자 유래의 검체들을 대상으로 *Coxiella burnetii*의 IS1111 타겟 유전자를 실시간 PCR 방법으로 분석한 결과, 실제 환자 유래의 각 시료들로부터 타겟 유전자인 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자를 검출할 수 있는 것으로 나타났고, 본 발명의 검출 세트를 이용한 실시간 PCR 방법은 기존 다른 검출 방법에 비해 검출 민감도가 더 우수한 것으로 나타났는데, 이는 기존 다른 검출 방법에서는 검출하지 못한 시료에 대해 본 발명의 키트를 이용한 실시간 PCR 방법에서는 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자를 검출할 수 있는 것으로 나타났다. 구체적으로, IS1111 N-PCR 방법(Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in the Sera of Patients with Q Fever Endocarditis or Vascular Infection. J Clin Microbiol. 2004 Nov;42(11):4919-24.)의 경우, 72.7%(16/22)의 민감도를 나타내었고, 실시간 PCR의 경우, cut-off를 ct38로 하였을 때, Q-PCR IS1111 기준방법(reference Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol. 2006; 6: 2.)은 22.7%(5/22)의 민감도를 보인 반면, 본 발명의 경우에는 81.2%(18/22)로 월등히 높은 민감도를 보이는 것으로 나타났다.

[0102]

따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 *Coxiella burnetii*의 IS1111 유전자 검출을 위한 큐열 진단용 프라이머 및 프로브는 우수한 민감도로 큐열을 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0103]

[0104]

<4-2> 특이도 분석

[0105]

특이도 확인을 위한 검체는 2015년부터 2019년 사이에 수집된 검체로, 타질환으로 확진된 환자로부터 수득한 검체를 대상으로 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석에는 본 발명에서 고안한 세트 1의 프라이머 및 프로브를 이용한 방법과 대조군으로는 기존의 PCR 방법을 사용하였다.

표 8

진단명	Lab no.	Specimens	IS1111 N-PCR	Q-PCR IS1111 _Reference	Q-PCR IS1111 _design(본 발명)
OM (osteomyelitis)	2019-039	WB	0	32.71	43.87
Anaplasmosis	2018-914	WB	0	33.12	Undetermined
EUO (Fever of unknown origin)	2019-101	WB	0	36.93	40.86
Tsutsugamushi	2018-1061	WB	0	37.76	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1062	WB	0	38.01	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1077	WB	0	38.21	Undetermined
Fever, unspecified	2019-111	WB	0	38.45	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1030	WB	0	38.97	Undetermined
Anaplasmosis	2018-792	WB	0	39.08	Undetermined
Viral meningitis	2018-449	WB	0	39.33	Undetermined
Q fever	2019-050	WB	0	Undetermined	39.61
Tsutsugamushi	2019-103	WB	0	39.86	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1196	WB	0	39.90	Undetermined
Q fever	2019-110	WB	0	40.31	40.16
Anaplasmosis	2018-721	WB	0	41.03	Undetermined
Fever, unspecified	2019-095	WB	0	41.39	Undetermined
Anaplasmosis	2018-944	WB	0	43.17	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1031	WB	0	Undetermined	Undetermined
Fever, unspecified	2019-109	WB	0	Undetermined	39.45
Scrub typhus	2018-1288	serum	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1167	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1176	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1151	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1177	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1227	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1289	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1201	WB	0	Undetermined	Undetermined
Fever, unspecified	2019-112	WB	0	Undetermined	Undetermined
acute leukemia	2018-1282	WB	0	Undetermined	Undetermined
viral meningitis	2018-774	WB	0	Undetermined	Undetermined
bacteremia	2018-981	WB	0	Undetermined	Undetermined
HAV	2018-999	WB	0	Undetermined	Undetermined
acute pyelonephritis	2019-029	WB	0	Undetermined	Undetermined
HAV	2019-147	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1078	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1079	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1200	WB	0	Undetermined	Undetermined
Tsutsugamushi	2018-1202	WB	0	Undetermined	Undetermined
Anaplasmosis	2018-383	WB	0	Undetermined	Undetermined
Anaplasmosis	2018-527	WB	0	Undetermined	Undetermined
Anaplasmosis	2018-541	WB	0	Undetermined	Undetermined
Anaplasmosis	2018-601	WB	0	Undetermined	Undetermined
Rt.hand cellulitis	2019-098	WB	0	Undetermined	Undetermined

[0106]

[0107]

분석 결과, 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브 (세트 1)를 이용한 키트를 이용하여 PCR을 수행한 경우, 거의 100%의 특이도를 보이는 것으로 나타난 반면, 기존 방법(Q-PCR IS1111_Reference)을 적용한 군에서는 약 90%의 특이도를 보이는 것으로 나타나 본 발명의 검출키트를 사용할 경우 종래 방법에 비해 규열을 더 높은 특이도로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0109]

<4-3> 환자 검체를 이용한 정확도 분석

[0110]

나아가 환자 검체를 대상으로 각각의 PCR을 수행하였고, 각 실험군에 대한 결과를 토대로 민감도 및 특이도 분석을 통해 규열 정확도 분석을 수행하였다. 이때 본 발명에서 고안된 세트 1의 검출키트 사용군에 대한 대조군으로 상기 실시예에서 대조군으로 사용한 IS1111 N-PCR 수행군 및 Q-PCR IS1111_Reference 수행군을 사용하였다. 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

검출 민감도 및 특이도 분석 결과

	IS1111 N-PCR		Q-PCR IS1111_Reference cutoff ≤ 38		Q-PCR IS1111_Design cutoff ≤ 38	
	양성대조	음성대조	양성대조	음성대조	양성대조	음성대조
양성	16	0	5	4	18	0
음성	6	43	17	39	4	43
민감도(%)	72.7		22.7		81.2	
신뢰구간(%)	49.6-88.4		8.7-45.8		59.0-94.0	
특이도(%)	100		90.7		100	
신뢰구간(%)	89.8-100		76.9-97.0		89.8-100	

[0111]

[0112]

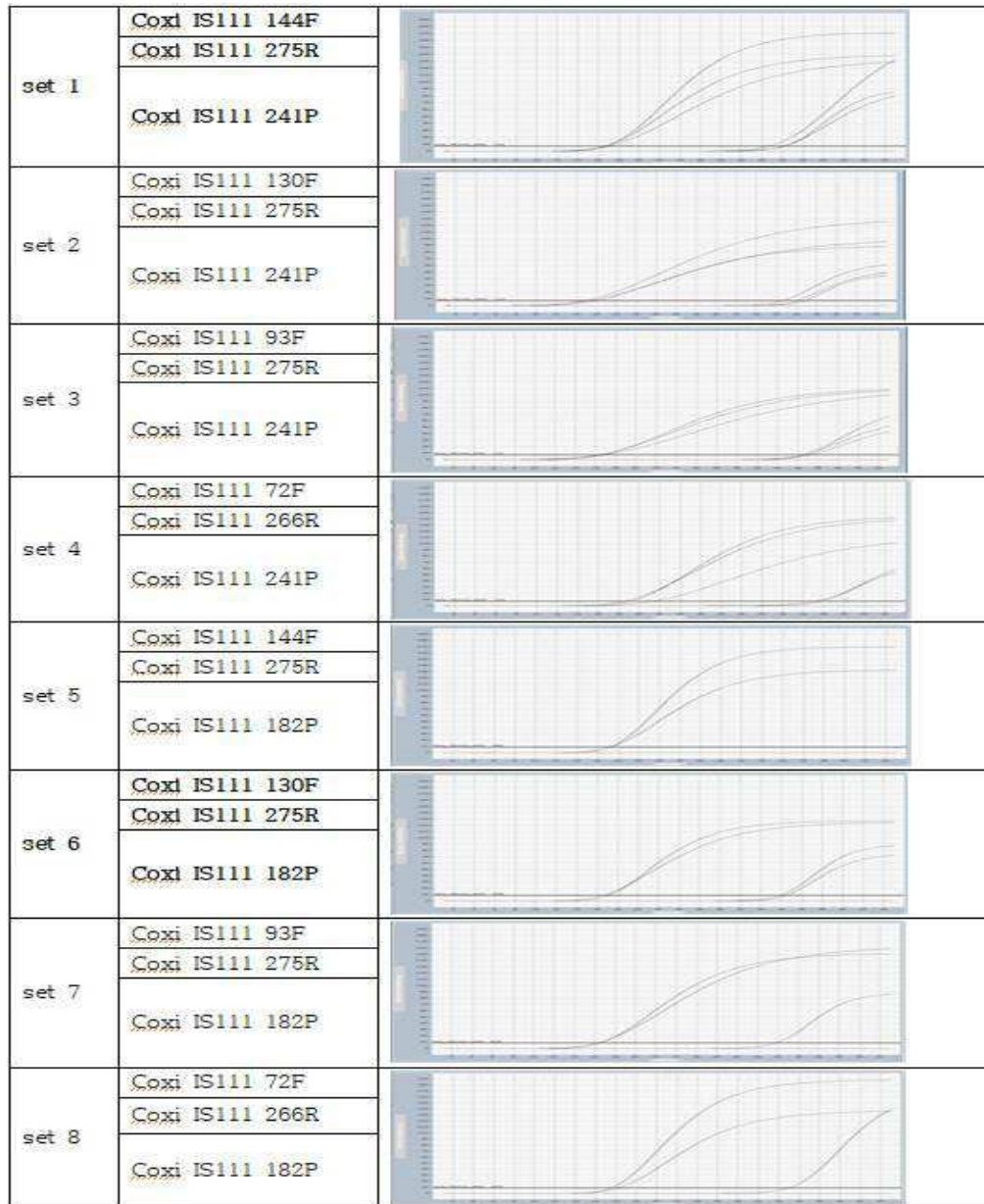
분석 결과, 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에서 고안한 *Coxiella burnetii*의 IS1111을 타겟으로 하는 프라이머 및 프로브를 이용한 실시간 PCR의 민감도는 Ct 값 38이하를 양성으로 정의하였을 때, 민감도가 81.2%, 특이도가 100%인 것으로 나타났으며, 이는 기존의 PCR 방법에 의한 민감도 및 특이도 보다 더 우수한 결과임을 알 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 *Coxiella burnetii*의 IS1111을 타겟으로 하는 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 높은 정확도로 신속하고 편리하게 큐열을 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0114]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chosun University
- <120> Composition for detecting Q fever and method of diagnosing Q fever using the same
- <130> NPDC92843
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coxi IS1111 144F primer	
<400>	1	
	gtggggtaaa gtgatctac	19
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coxi IS1111 275R primer	
<400>	2	
	cccataaacg tccgatac	18
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coxi IS1111 241P probe	
<400>	3	
	cacacgcttc catcaccacg	20
<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coxi IS1111 130F primer	
<400>	4	
	tgtggaattg atgagtgg	18
<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Coxi IS1111 93F primer	
<400>	5	

actgggtgtt gatattgc	18
<210> 6	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Coxi IS1111 72F primer	
<400> 6	
gtccatgaaa gatattaaaa tactg	25
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Coxi IS1111 266R primer	
<400> 7	
gtccgatacc aatggttc	18
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Coxi IS1111 144F primer	
<400> 8	
gtggggtaaa gtgatctac	19
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Coxi IS1111 182P primer	
<400> 9	
ctcagtatgt atccaccgta gccag	25
<210> 10	
<211> 1095	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Coxiella burnetii IS1111 DNA sequence

<400> 10

atggacccac cccttaaaga cggcgtcata atgcgccaac atagaatttc tattttcaaa	60
aaaaggagaa ggtccatgaa agatattaaa atactgggtg ttgatattgc aaaagatgtt	120
tttcaactgt gtggaattga tgagtgggtt aaagtgatct acacgagacg ggttaagcgt	180
gctcagtatg tatccaccgt agccagtctt aaggtgggtt gcgtgggtgat ggaagcgtgt	240
ggaggagcga accattggta tcggacgttt atggggatgg gtatccaac gcagttgatc	300
agtccgcagc acgtcaaacc gtatgtcaaa agtaacaaga atgacgttaa cgatgcgcag	360
gcgatagctg aagcggcttc ccgcgcctcg atcgggtttg tgcagggtaa aacgggtggaa	420
caacaagacg ttcaagcgtt gttaaagata cgcgatcggt tagtcaaaag ccgcacggcg	480
ctgatcaatg agattcgggg gttgttgcaa gaatacggac tcacgatggc gcgtggtgcc	540
aagcgatttt atgaagagct cccgttgatt ttagcgagcg aagcgggtggg attaacaccg	600
cggatgaaac ggggtgtgaa ttgtttgtat accgaattgt tgaaccggga cgaagcgatt	660
ggtgattacg aggaggaatt aaaagcgggt gcaaaagcca atgaggattg tcaacgggta	720
cagagcatcc cgggggtggg ttatttaacg gcgctctcgg tttatgcgag cgtgggtgac	780
attcatcaat ttcatcggtc ccggcagttg tcggcggtta ttgggttggg ccctcgacaa	840
cattcgagtg ggaataagga ggtgttggtt gggattagta aacgcggcaa tgtgatgta	900
aggacgttat tgattcatgg cgcccgtgct ctattgcgtc atgtaaaaaa taaaacggat	960
aaaaagagtc tgtggttaaa agcactcatt gacgcccgcg gaatgaatcg cgcttgtgtg	1020
gcgttagcga ataaaaatgc gccgatcatt tgggcgcttt taacacgcca agaaacgtat	1080
cgctgtggcg cctaa	1095