

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 5월 22일 (22.05.2020) WIPO | PCT

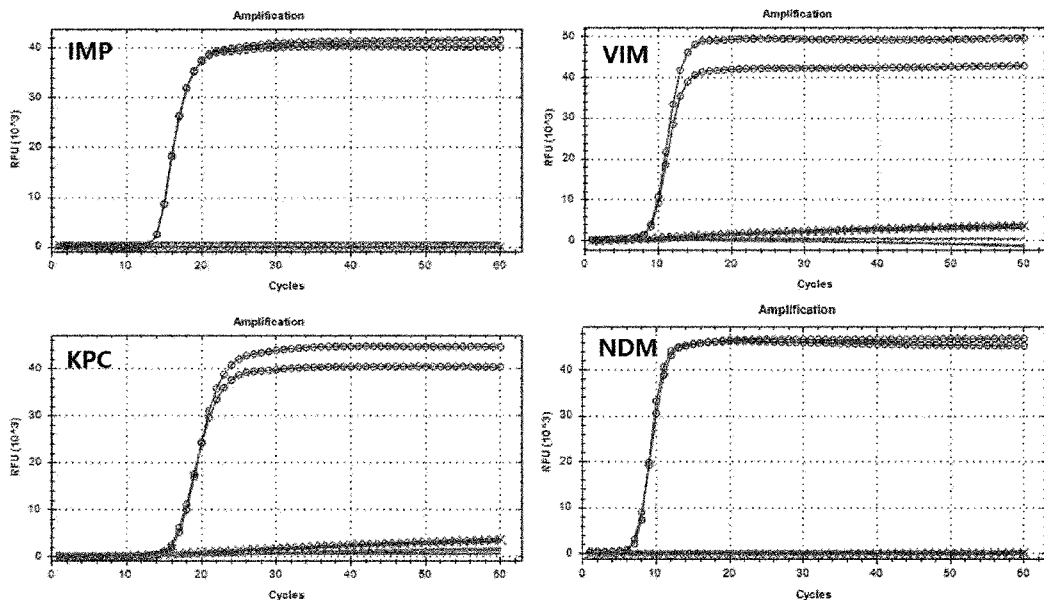


(10) 국제공개번호
WO 2020/101194 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/689* (2018.01) *C12Q 1/24* (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/013707
- (22) 국제출원일: 2019년 10월 18일 (18.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0141717 2018년 11월 16일 (16.11.2018) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222 (반포동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 강래형 (KANG, Lae Hyung); 05642 서울시 송파구 백제고분로48나길 7-9, 202호 (방이동, 백합), Seoul (KR). 백순영 (PAIK, Soon Young); 02567 서울시 동대문구 정릉천동로 36, 107동 1502호 (용두동, 래미안허브리츠), Seoul (KR). 박연준 (PARK, Yeon Joon); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 121동 2202호 (반포동, 반포자이아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

(54) Title: PRIMER SET FOR LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION REACTION FOR DIAGNOSING CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 카바페넴아제 생성 장내세균 진단을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention pertains to: a primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnosing carbapenemase-producing enterobacteriaceae; and a use thereof. More specifically, the present invention pertains to: a primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for IMP, VIM, KPC, and NDM, which are known as carbapenemase-producing genes; and a method for diagnosing carbapenemase-producing enterobacteriaceae using same. According to the present invention, it was found that a primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for detecting carbapenemase-producing enterobacteriaceae can be used to perform a test within one hour using only simple equipment, and effectively detect only carbapenemase-producing

[다음 쪽 계속]

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

enterobacteriaceae, and can thus effectively provide information on whether to administer carbapenem.

(57) 요약서: 본 발명은 카바페넴아제 생성 장내세균 진단을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 카바페넴아제 생성 유전자로 알려진 IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이를 이용한 카바페넴아제 생성 장내세균 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명은 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 간단한 장비만 가지고도 1 시간 내에 검사를 수행할 수 있는 것을 확인하였으며, 카바페넴아제 생성 장내세균만을 효과적으로 검출하는 것을 확인하였으므로, 카바페넴 투여 여부에 관한 정보를 효과적으로 제공할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 카바페넴아제 생성 장내세균 진단을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 카바페넴아제 생성 장내세균 진단을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 카바페넴아제 생성 유전자로 알려진 IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 및 이를 이용한 카바페넴아제 생성 장내세균 진단 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 카바페넴계열의 항생제는 그람음성세균 감염의 치료제로 광범위하게 사용되고 있는 항생제이다. 카바페넴계열의 항생제로는 이미페넴(imipenem), 메로페넴(meropenem), 인반즈(Invanz, ertapenem) 및 도리페넴(doripenem) 등이 있다. 현재 카바페넴계열의 항생제는 가장 강력한 항생제로 알려져 있으며, 주로 중증도 감염환자에게 사용되고 있다.
- [4] 하지만 항생제의 무분별한 사용으로 인하여, 여러 항생제에 내성을 지니는 세균이 발생하여 사회적으로 문제가 되고 있다. 카바페넴계열의 항생제 또한 내성균주발생이 전 세계적으로 보고되면서 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 이러한 카바페넴계열의 항생제에 내성을 지니는 장내세균을 카바페넴 내성 장내세균(carbapenem resistant enterobacteriaceae; CRE)이라고 한다. 이러한 카바페넴계열의 항생제에 내성을 지니는 장내세균은 β -락타마아제(β -lactamase)라는 효소를 생성하여 카바페넴계열의 항생제를 무력화시키는 것으로 알려져 있으며, β -락타마아제는 항생제의 불활화(Enzyme inactivation)를 초래하여 항생제 내성을 유발하게 된다. 카바페넴계열의 항생제에 내성을 지니는 균으로는 대표적으로 대장균(*E.coli*)과 폐렴 간균(*Klebsiella pneumoniae*)이 있으며, 이외에도 β -락타마아제 효소를 생성할 수 있는 유전자를 가지고 있는 여러 균주들이 내성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] β -락타마아제를 생성하는 유전자로는 NDM 유전자를 비롯하여, KPC, IMP, GES, SIM, VIM 등의 유전자들이 보고되고 있다. 이러한 β -락타마아제 효소를 생성하는 유전자들은 여러 종류의 유전자형으로 존재하고 있다. 이중 가장 대표적인 NDM(New Delhi metallo beta lactamase)은 2008년 스웨덴 환자가 인도 뉴델리에서 수술 중 감염된 사실이 확인된 후 명명되었다. NDM 유전자를 가지고 있는 박테리아는 현존하는 거의 모든 항생제에 내성이 있는 것으로 알려져 치명적인데, 최근 인도와 파키스탄에서 발생한 후 미국과 일본 등지에서도 잇따라 발견되면서 전세계로 확산될 가능성이 높아서 감염

전문가들은 우려하고 있다. 이와 같이 CRE를 비롯한 다제내성 균의 위험성이 전세계적으로 대두되면서 한국에서도 2010년 9월에 다제내성균 중 '카바페넴 내성 장내균(CRE)'을 법정 전염병으로 긴급 지정했다.

- [6] 그런데 최근 카바페넴 항생제를 직접 분해할 수 있는 카바페넴아제(carbapenemase)라는 효소를 생성하는 카바페넴아제 생성 장내세균(carbapenemase producing enterobacteriaceae; CPE)이 출현하였다. 국내에서는 2012년까지 총 59건의 CPE가 확인되었으며, 2013년 7월 국내에 보고되지 않은 새로운 CPE가 확인됨에 따라 질병관리본부에서 역학조사를 실시하여 13개 병원, 63명의 환자가 CPE에 감염된 것으로 확인되었다. CPE는 CRE 중에서도 항생제를 직접 분해할 수 있는 효소를 생성하는 유전자를 가진 CRE의 일종으로, 플라스미드(plasmid)에 의해 다른 균주에 내성을 전달할 수 있는 가능성이 있다. 대표적인 CPE로는 KPC(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 및 NDM-1(New Delhi metallo- β -lactamase-1) 등이 있다.
- [7] 일반적으로 카바페넴 내성 장내균의 감염 여부를 검사하는 방법으로는 디스크 확산법, MHT(Modified Hodge Test) 방법, 카파 NP 시험(Carbapenemase Nordmann-poirel test), 카바페넴아제(Cabapenemase) 억제 시험, PCR 증폭·전기영동방법, DNA 시퀀싱(sequencing) 방법들이 사용되어 있다.
- [8] 종래의 디스크 확산방식을 이용한 카바페넴 내성 장내균의 감염 여부 검사방법은 사용하는 균배양 배지의 종류, 희석비율 등의 기술적 오류에서 야기되는 낮은 민감도 및 검사결과 판독의 모호함 그리고 무엇보다도 검사결과 지연의 단점이 있어 신속하면서 정확하게 카바페넴 내성 장내균의 감염 여부를 판단하는데 한계가 있고, 또한, DNA 시퀀싱(sequencing) 검사법은 그 결과가 정확하기는 하지만 한 번 내지 두 번의 검사로 한가지의 시료만을 검사할 수 있으며 검사비용이 많이들 뿐만 아니라 검사에 시간이 오래 걸리는 단점이 있다.
- [9] 또한, 마이크로어레이 방식의 DNA 칩은 한 장의 슬라이드에 수십에서 수만 종류의 유전자를 동시에 검사할 수 있는 방법이나, PCR 증폭반응 후의 산물을 프로브가 집적된 DNA 칩에 혼성화하여 단순히 유전자형만을 식별하는 종말점 분석(end-point analysis)방법이다. 그런데 PCR 증폭 과정은 DNA 증폭율이 일정하고 재현성이 높은 기하 급수적 단계(exponential phases)를 지나 PCR 증폭에 필요한 성분이 점점 고갈되기 시작하면서 증폭율이 감소하기 시작하여 DNA 양이 산술적으로 증가하는 선형 단계(linear phases)를 거쳐 PCR 증폭이 멈추는 시기로 재현성이 가장 낮은 안정 단계(plateau phases)로 진행된다. 이러한 이유로 마이크로어레이 DNA 칩 방식의 가장 큰 문제점은 특이도와 민감도를 모두 만족시키면서 다수개의 표적 유전자를 검출할 수 있는 PCR 증폭용 프라이머 및 프로브의 설계가 어렵고 양성·음성 판정을 위한 형광세기의 컷오프 값을 결정하기 어려운 문제점이 있다.
- [10] 이러한 문제점을 해결하기 위해 종래의 디스크 확산법, DNA 시퀀싱법, 멀티플렉스 마이크로어레이 DNA 칩을 대신하여 카바페넴 내성 장내균의

감염여부를 조기에 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검사할 수 있는 방법의 개발이 시급한 상황이다.

[11] 카바페넴아제 생성 장내세균의 검출 또는 진단은 현재로서 실시간 PCR을 이용한 엑스퍼트(Xpert; Cepheid)를 이용하여 2시간 내에 진단하는 방법이 최선이나, 엑스퍼트의 경우 고가의 장비 및 시약이 요구되며, 시간도 2시간이나 걸리는 단점이 있다.

[12] 한편, 루프 매개 등온 증폭(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) 방법은 단순하고 빠른 등온 증폭 방법으로 가닥변이 DNA 합성(strand displacement DNA synthesis) 기능을 가지는 Bst DNA 중합효소(polymerase)를 이용한 방법이다. 두 쌍의 특이적 프라이머를 이용하여 루프를 형성한 후 계속적으로 증폭시키는 방법으로, 고가의 장비 없이 특정 DNA를 원스텝(one step)으로 증폭할 수 있어, 기초 과학뿐만 아니라 여러 임상적 샘플에서 진단 및 검출 방법으로 이용되고 있다.

[13]

[14] 이에, 본 발명에서는 카바페넴아제 생성 장내세균을 신속하고 효과적으로 진단하기 위해 노력한 결과, LAMP 반응을 위한 프라이머 세트를 제작하였으며, 본 발명의 프라이머 세트는 간단한 가열블록(heating block) 등의 장비만 가지고도 1시간 내에 검사를 수행할 수 있는 것을 확인하였으며, 효과적으로 카바페넴아제 생성 장내세균을 진단하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명의 목적은 카바페넴아제 생성 장내세균 진단을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.

[17] 본 발명의 다른 목적은 상기 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 포함하는 카바페넴아제 생성 장내세균 진단 키트를 제공하는 데 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 이용한 카바페넴아제 생성 장내세균 진단방법을 제공하는 데 있다.

[19]

과제 해결 수단

[20] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은

[21] (1) 서열번호 1 내지 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트;

[22] (2) 서열번호 15 내지 서열번호 20의 염기서열로 구성되는 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트;

[23] (3) 서열번호 29 내지 서열번호 34의 염기서열로 구성되는 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트; 및

- [24] (4) 서열번호 43 내지 서열번호 48의 염기서열로 구성되는 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트; 중 어느 하나 이상의 프라이머 세트에 구성되는, 카바페넴아제 생성 장내세균(carbapenemase producing enterobacteriaceae; CPE) 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)용 프라이머 세트를 제공한다.
- [25] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 2의 역방향 프라이머, 서열번호 3의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 4의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 5의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 6의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [26] 상기 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 15의 정방향 프라이머, 서열번호 16의 역방향 프라이머, 서열번호 17의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 18의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 19의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 20의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [27] 상기 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 29의 정방향 프라이머, 서열번호 30의 역방향 프라이머, 서열번호 31의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 32의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 33의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 34의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [28] 상기 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 43의 정방향 프라이머, 서열번호 44의 역방향 프라이머, 서열번호 45의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 46의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 47의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 48의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성될 수 있다.
- [29] 본 발명의 다른 바람직한 일실시예에서, 상기 카바페넴아제 생성 장내세균은 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumonia*), 슈도모나스균(*Pseudomonas spp.*), 세라티아균(*Serratia spp.*), 시트로박터균(*Citrobacter spp.*), 아시네토박터균(*Acinetobacter spp.*), 모르가넬라균(*Morganella spp.*), 프로비덴시아균(*Providencia spp.*) 및 엔테로박터균(*Enterobacter spp.*) 으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [30]
- [31] 본 발명은 또한, 루프 매개 등온증폭 반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)용 프라이머 세트를 포함하는 카바페넴아제 생성 장내세균 검출용 키트를 제공한다.
- [32] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 키트는 루프 매개 등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수를 더 포함할 수 있다.

- [33]
- [34] 본 발명은 또한,
- [35] (a) 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
- [36] (b) 상기 추출된 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 루프 매개 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [37] (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 방법을 제공한다.
- [38] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 (a) 단계의 시료는 분변 또는 직장면봉법(rectal swab)으로 획득할 수 있다.
- [39] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에서, 상기 루프 매개 등온증폭 반응은 60°C 내지 70°C에서 수행될 수 있다.

[40]

발명의 효과

- [41] 본 발명은 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 간단한 장비만 가지고도 1시간 내에 검사를 수행할 수 있는 것을 확인하였으며, 효과적으로 카바페넴아제 생성 장내세균을 검출하는 것을 확인하였으므로, 카바페넴 투여 여부에 관한 정보를 효과적으로 제공할 수 있다.

[42]

도면의 간단한 설명

- [43] 도 1은 루프 매개 등온 증폭(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) 방법에 대한 모식도이다.
- [44] 도 2는 2종류의 IMP 유전자 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교한 데이터이다. 도 2a 내지 도 2c는 각각의 시료 시료에 따른 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 결과이다. IMP-1은 표 1의 프라이머 세트, IMP-2는 표 2의 프라이머 세트를 의미하며, ○ 표시가 있는 곡선은 양성대조군을, x 표시가 있는 곡선은 음성 대조군을 나타낸다.
- [45] 도 3은 2종류의 VIM 유전자 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교한 데이터이다. 도 3a 내지 도 3f는 각각의 시료 시료에 따른 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 결과이다. VIM-1은 표 3의 프라이머 세트, VIM-2는 표 4의 프라이머 세트를 의미하며, ○ 표시가 있는 곡선은 양성대조군을, x 표시가 있는 곡선은 음성 대조군을 나타낸다.
- [46] 도 4는 2종류의 KPC 유전자 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교한 데이터이다. 도 4a 내지 도 4e는 각각의 시료 시료에 따른 카바페넴아제 생성

장내세균 검출 결과이다. KPC-1은 표 5의 프라이머 세트, KPC-2는 표 6의 프라이머 세트를 의미하며, ○ 표시가 있는 곡선은 양성대조군을, × 표시가 있는 곡선은 음성 대조군을 나타낸다.

[47] 도 5는 2종류의 NDM 유전자 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교한 데이터이다. 도 5a 내지 도 5e는 각각의 시료 시료에 따른 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 결과이다. NDM-1은 표 7의 프라이머 세트, NDM-2는 표 8의 프라이머 세트를 의미하며, ○ 표시가 있는 곡선은 양성대조군을, × 표시가 있는 곡선은 음성 대조군을 나타낸다.

[48] 도 6은 본 발명의 등온 증폭 반응용 프라이머 세트의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 특이도를 확인한 결과이다. ○ 표시가 있는 곡선은 양성대조군을, × 표시가 있는 곡선은 음성 대조군을 나타낸다.

[49]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[50] 상술한 바와 같이, 카바페넴 내성 장내세균의 감염여부를 조기에 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검사할 수 있는 방법의 개발이 시급한 실정이다. 실시간 PCR을 이용한 엑스퍼트(Xpert; Cepheid)를 이용하여 2시간 내에 카바페넴아제 생성 장내세균을 검출하는 방법이 사용되고 있으나, 엑스퍼트의 경우 고가의 장비 및 시약이 요구되는 단점이 있다.

[51] 이에, 본 발명에서는 카바페넴아제 생성 장내세균을 신속하고 효과적으로 검출하기 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 제작하고자 하였다. 카바페넴아제 생성 유전자로 알려진 IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 제조하였으며, 상기 프라이머 세트는 일반 PCR을 이용한 검출 방법과 유사한 민감도 보이며, 간단한 장비만 가지고도 1시간 내에 카바페넴아제 생성 장내세균만을 효율적으로 검출하는 효과가 있다.

[52]

[53] 따라서, 본 발명은 (1) 서열번호 1 내지 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트;

[54] (2) 서열번호 15 내지 서열번호 20의 염기서열로 구성되는 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트;

[55] (3) 서열번호 29 내지 서열번호 34의 염기서열로 구성되는 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트; 및

[56] (4) 서열번호 43 내지 서열번호 48의 염기서열로 구성되는 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트; 중 어느 하나 이상의 프라이머 세트로 구성되는, 카바페넴아제 생성 장내세균(carbapenemase producing enterobacteriaceae; CPE) 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)용

프라이머 세트를 제공한다.

- [57] 본 발명의 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3'-hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사 효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에서 공지된 것을 기초로 변형이 가능하다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 당업계에 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제작하여 사용할 수 있다.
- [58] 또한, 본 발명의 "프라이머(primer)"는 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드로서, 적합한 조건(4가지의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 DNA 또는 RNA 폴리머라아제와 같은 중합효소의 존재), 적합한 온도 및 적합한 버퍼하에서 주형-지시적 DNA 합성을 개시할 수 있는 개시점으로서 작용하는 것을 의미한다. 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [59] 상기 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자 하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 8 내지 500bp의 길이로 사용할 수 있다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적인 것을 사용할 수 있다.
- [60] 본 발명의 "루프 매개 등온 증폭 반응(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)"은 가닥변이 DNA 합성(strand displacement DNA synthesis) 기능을 가지는 Bst DNA 중합효소(polymerase)를 이용한 방법으로, 두 쌍의 특이적 프라이머를 이용하여 루프를 형성한 후 계속적으로 증폭시키는 방법이다. 도 1의 모식도에 나타난 바와 같이, 정방향 프라이머(forward primer), 역방향 프라이머(backward primer), 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하게 된다.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 2의 역방향 프라이머, 서열번호 3의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 4의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 5의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 6의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [62] 상기 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 15의 정방향 프라이머,

- 서열번호 16의 역방향 프라이머, 서열번호 17의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 18의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 19의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 20의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [63] 상기 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 29의 정방향 프라이머, 서열번호 30의 역방향 프라이머, 서열번호 31의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 32의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 33의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 34의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되며,
- [64] 상기 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 43의 정방향 프라이머, 서열번호 44의 역방향 프라이머, 서열번호 45의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 46의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 47의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 48의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 카바페넴아제 생성 장내세균은 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumonia*), 슈도모나스균(*Pseudomonas spp.*), 세라티아균(*Serratia spp.*), 시트로박터균(*Citrobacter spp.*), 아시네토박터균(*Acinetobacter spp.*), 모르가넬라균(*Morganella spp.*), 프로비덴시아균(*Providencia spp.*) 및 엔테로박터균(*Enterobacter spp.*)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게, 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumonia*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 시트로박터 프룬디(*Citrobacter freundii*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 엔테로박터 클로아카(*Enterobacter cloacae*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*) 및 프로비덴시아 스투아르티(*Providencia stuartii*)이나, 카바페넴아제를 생성하는 IMP, VIM, KPC 및 NDM 유전자 중 하나 이상의 유전자를 발현하는 것으로 알려진 장내세균을 제한없이 검출 할 수 있다.
- [66] 본 발명의 구체적인 일실시예에 있어서, 본 발명에서는 IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 각 두세트씩 제조하여 카바페넴아제 생성 장내세균 검출에 대한 민감도 및 효율이 높은 프라이머 세트를 선별하고자 표 1 내지 표 8에 해당하는 프라이머 세트를 제작하였다. 또한, 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트와 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교하여 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도 및 효율을 비교하기 위해 표 9 및 표 10에 대한 프라이머 세트를 제작하여, 카바페넴아제 생성 장내세균에서 분리한 DNA를 이용하여 비교실험을 수행하였다.
- [67] 그 결과, 도 2 내지 도 5에 나타난 바와 같이, 2 개의 등온증폭 반응용 프라이머 세트 간의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 확인한 결과, 표 1, 표 3, 표 5 및 표 7에 해당하는 프라이머 세트가 표 2, 표 4, 표 6 및 표 8에 해당하는

프라이머 세트보다 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도가 높은 것을 확인하였다. 즉, 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 서열에 따라 검출 민감도가 큰 차이를 보이는 것을 확인하였다. 또한, 도 2 내지 도 5 및 표 13에 나타난 바와 같이, 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 일반 PCR과 유사한 민감도를 보이는 것을 확인하였다.

[68] 상기 결과를 바탕으로 본 발명에서는 IMP 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1, VIM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1, KPC 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1 및 NDM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1이 카바페넴아제 생성 장내세균 검출에 적합한 것을 확인하였다.

[69] 본 발명의 구체적인 다른 일실시예에 있어서, 상기 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트가 실제로 카바페넴아제 생성 장내세균만을 특이적으로 검출할 수 있는지 확인하고자 다양한 종류의 일반 균주, 카바페넴 내성 장내세균(carbapenem resistant enterobacteriaceae; CRE), ESBL(Extended-spectrum beta-lactamases) 및 비-ESBL(non Extended-spectrum beta-lactamases)을 이용하여 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 등온증폭 반응을 수행한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 양성 대조군에서만 반응이 나타났으며, 카바페넴아제 생성 장내세균이 아닌 균주에서는 반응이 전혀 없는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 ESBL 생성 장내세균 및 카바페넴 내성 장내세균과 카바페넴아제 생성 장내세균을 명확하게 구별하여 검출 할 수 있는 것을 확인하였다.

[70]

[71] 본 발명은 또한, 루프 매개 등온증폭 반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)용 프라이머 세트를 포함하는 카바페넴아제 생성 장내세균 검출용 키트를 제공한다.

[72] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 통상적으로 키트에 포함되는 것이라면 특별히 제한하지 않으나, 바람직하게는 루프 매개 등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수 등을 포함할 수 있다.

[73] 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다.

[74]

[75] 본 발명은 또한,

[76] (a) 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;

- [77] (b) 상기 추출된 DNA를 주형으로 하고,
- [78] (1) 서열번호 1 내지 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트;
- [79] (2) 서열번호 15 내지 서열번호 20의 염기서열로 구성되는 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트;
- [80] (3) 서열번호 29 내지 서열번호 34의 염기서열로 구성되는 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트; 및
- [81] (4) 서열번호 43 내지 서열번호 48의 염기서열로 구성되는 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트; 중 어느 하나 이상의 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 이용하여 루프 매개 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [82] (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 방법을 제공한다.
- [83] 상기 (a) 단계는 시료로부터 DNA를 분리하는 단계로, 상기 시료는 생물 개체로부터 채취한 분변 또는 직장면봉법으로 수득한 것을 특징으로 하며, 상기 시료는 필요에 따라 생물 시료를 균질화 및 추출 등의 필요한 임의의 전처리를 실시하여 얻은 시료일 수 있다. 이러한 전처리는 대상이 되는 생물 시료에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다.
- [84] 상기 시료로부터 수득되는 DNA는 개체에서 얻은 분변 또는 직장면봉법(rectal swab)으로 수득한 샘플로부터 상업적으로 이용 가능한 DNA 추출 키트를 사용하여 수득하는 등, 당업계에 널리 알려진 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 뉴클레오티드의 양이 적을 때에는 필요에 따라 뉴클레오티드를 증폭시키는 조작을 실시할 수 있다. 증폭 조작은, 예컨대 DNA 중합효소 등의 효소를 이용한 PCR 방법을 통해 수행할 수 있다.
- [85] 다음으로, 상기 (b) 단계는 시료부터 추출한 DNA를 주형으로 하여 루프 매개 등온증폭 반응을 수행하는 단계로, 본 발명의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 사용하여 수행하며, 바람직하게는 60°C 내지 70°C에서, 더 바람직하게는 65°C에서 수행하는 것을 특징으로 한다.
- [86] 상기 루프 매개 등온증폭반응은 기존의 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)방법과 유사하나, 기존 중합효소연쇄반응이 변성, 접합, 및 신장의 세 단계를 반복적으로 수행하면서 타겟 유전자가 증폭되므로 반응과정 중 지속적으로 온도의 변화를 필요로 하는 반면, 상기 루프 매개 등온증폭반응은 일정 온도에서 접합 및 신장이 이루어질 수 있다. 상기 루프 매개 등온증폭반응은 Taq DNA 중합효소(polymerase) 대신, 핵산말단가수분해효소(exonuclease) 활성을 보유한 Bst DNA 중합효소를 사용하므로 열에 의존하지 않고 DNA의 이중나선 구조의 변성을 유발할 수 있다.
- [87] 마지막으로, 상기 (c) 단계는 증폭 산물을 검출하는 단계로, 상기 루프 매개

등온증폭 반응용 프라이머에 의해 IMP, VIM, KPC 및 NDM 유전자 각각이 특이적으로 증폭하게 되며, IMP, VIM, KPC 및 NDM 유전자 중 하나라도 증폭이 되면 카바페넴아제 생성 장내세균인 것으로 판별할 수 있다.

[88] 증폭 산물의 생성 여부는, 증폭 표적 서열에 검출 가능한 표지 물질을 표지 하여 검출 할 수 있으며, 하나의 구체적 예로서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사선을 발하는 물질일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[89] 상기 표지물질은 육안, 센서 또는 기타 수단에 의해 식별될 수 있으며, 바람직하게는 상기 표지물질은 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 디니트로페놀(dinitrophenol), 아미노아세틸플루오렌(aminoacetylfluorene), 설푸네이트, FITC(Fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 아미노메틸쿠아민(aminomethylcoumarin), FAM(Carboxyl fluorescein-aminoethyl-amidite), TAMRA(Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine) 및 시아닌(Cyanine)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 표지로서 기능할 수 있으면 그 종류가 특별히 제한되는 것은 아니다.

[90]

[91] 나아가, 본 발명은 상기 카바페넴아제 생성 장내세균 검출방법을 이용한, 카바페넴 투여 여부에 대한 정보 제공방법을 제공한다.

[92] 본 발명의 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 이용하였을 때, IMP, VIM, KPC 및 NDM 유전자 중 하나라도 증폭이 되면 카바페넴아제 생성 장내세균인 것으로 판별할 수 있으며, 이 경우에는 카바페넴 투여를 하지 않는 것으로 결정하도록 정보를 제공할 수 있다.

[93]

[94] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[95] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[96]

[97] 실시예 1: 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 제작

[98] 1-1: 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트

[99] 본 발명에서는 카바페넴아제 생성 유전자로 알려진 IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 제조하였으며,

[100] 루프 매개 등온 증폭(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) 방법은 가닥변이 DNA 합성(strand displacement DNA synthesis) 기능을 가지는 Bst DNA 중합효소(polymerase)를 이용한 방법으로, 두 쌍의 특이적 프라이머를 이용하여 루프를 형성한 후 계속적으로 증폭시키는 방법이다. 본 발명에서는 효과적으로 루프 매개 등온증폭을 수행하기 위해 도 1의 모식도에 나타난 바와 같이, 정방향 프라이머(forward primer), 역방향 프라이머(backward primer), 정방향 내부

프라이머(Forward inner primer; FIP), 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성된 프라이머 세트를 제작하였다.

- [101] 또한, IMP, VIM, KPC 및 NDM에 대한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 각 두세트씩 제조하여 카바페넴아제 생성 장내세균 검출에 대한 민감도 및 효율이 높은 프라이머 세트를 선별하였다. 프라이머는 마크로젠에 의뢰하여 제조하였으며, 각 프라이머 서열은 하기 표 1 내지 표 8 과 같다.

[102]

[103] [표1]

IMP 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GGGCGTTGTTCTAAACA	138	18	59.9	50	서열번호 1
B3	TTGTGGCTTGAACCTTACC	400	19	60	47.4	서열번호 2
FIP(F1c+F2)	CGCTCCACAAACCAAGTACTAATGCTGAGGCTTACCTAATTG		43			서열번호 3
BIP(B1c+B2)	CATTTTCATAGCGACAGCACGGTGCATACGTGGG GATAGAT		41			서열번호 4
LoopF	TCTTTAGCCGTAAATGGAGTGT	218	22	61.8	40.9	서열번호 5
LoopB	GCGGAATAGAGTGGCTTAATTC	305	22	61.5	45.5	서열번호 6
Product	ATGCTGAGGCTTACCTAATTGACACTCCATTTACG GCTAAAGATACTGAAAAGTTAGTCACTTGGTTTGT GGAGCGTGGCTATAAAATAAAAGGCAGCATTTCC TCTCATTTTCATAGCGACAGCACGGGCGGAATAG AGTGGCTTAATTCTCGATCTATCCCCACGTATGCA		173	70.1	43.4	서열번호 7

[104] [표2]

IMP 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-2

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GGGCGTTGTTCTAAACA	138	18	59.9	50	서열번호 8
B3	GGCTTGAACCTTACCGTC	396	18	60.1	55.6	서열번호 9
FIP(F1c+F2)	CGCTCCACAAACCAAGTACTAATGCTGAGGCTTACCTAATTG		43			서열번호 10
BIP(B1c+B2)	CATTTTCATAGCGACAGCACGGTGCATACGTGGG GATAGAT		41			서열번호 11
LoopF	TCTTTAGCCGTAAATGGAGTGT	218	22	61.8	40.9	서열번호 12
LoopB	GCGGAATAGAGTGGCTTAATTC	305	22	61.5	45.5	서열번호 13
Product	ATGCTGAGGCTTACCTAATTGACACTCCATTTACG GCTAAAGATACTGAAAAGTTAGTCACTTGGTTTGTGG AGCGTGGCTATAAAATAAAAGGCAGCATTTCTCTC ATTTTCATAGCGACAGCACGGGCGGAATAGAGTGG CTTAATTCTCGATCTATCCCCACGTATGCA		173	70.1	43.4	서열번호 14

[105] [표3]

VIM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GGTGAGTATCCGACAGTCA	91	19	60.5	52.6	서열번호 15
B3	GTCATGAAAGTGCGTGGA	351	18	60	50	서열번호 16
FIP(F1c+F2)	GGTAGACCGCGCCATCAACAGATTGCCGATGGTGT T		36			서열번호 17
BIP(B1c+B2)	TGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCAATCTCCGCGAGA AGTG		40			서열번호 18
LoopF	ACGACTGCGTTGCGATAT	184	18	61.9	50	서열번호 19
LoopB	CTTTTGATTGATACAGCGTGGG	241	22	62.2	45.5	서열번호 20
Product	CAGATTGCCGATGGTGTTGGTCGCATATCGCAACG CAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGT CTCATTGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTG ATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACTT CTCGCGGAGATTG		157	73.6	52.9	서열번호 21

[106] [표4]

VIM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-2

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GGTGAGTATCCGACAGTCA	91	19	60.5	52.6	서열번호 22
B3	GTCATGAAAGTGCGTGGA	351	18	60	50	서열번호 23
FIP(F1c+F2)	ATGAGACCATTGGACGGGTAGACAGATTGCCGAT GGTGTT		40			서열번호 24
BIP(B1c+B2)	TGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCAATCTCCGCGAG AAGTG		40			서열번호 25
LoopF	ACGACTGCGTTGCGATAT	184	18	61.9	50	서열번호 26
LoopB	CTTTTGATTGATACAGCGTGGG	241	22	62.2	45.5	서열번호 27
Product	CAGATTGCCGATGGTGTTGGTCGCATATCGCAAC GCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATG GTCTCATTGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGA TTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGC ACTTCTCGCGGAGATTG		157	73.6	52.9	서열번호 28

[107] [표5]

KPC 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	CGTGACGGAAAGCTTACAA	552	19	60.4	47.4	서열번호 29
B3	GTAGACGGCCAACACAAT	786	18	59.7	50	서열번호 30
FIP(F1c+F2)	GCCGGTCGTGTTTCCCTTAACTGACACTGGGCTCT		36			서열번호 31
BIP(B1c+B2)	ACTGGGCAGTCGGAGACAAGACGACGGCATAGTCAT		36			서열번호 32
LoopF	AGCCAATCAACAACTGCTG	629	20	61.7	45	서열번호 33
LoopB	GAGTGTATGGCACGGCAA	713	18	62.5	55.6	서열번호 34
Product	AAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGCAGCGGCAGCAGTTTGTGATTGGCTAAAGGGAAA CACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGCGGT GCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGG AACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTAT GCCGTCGTCT		178	77.5	61.2	서열번호 35

[108] [표6]

KPC 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-2

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GTGTACGCGATGGATACC	136	18	59.7	55.6	서열번호 36
B3	CCAACTCCTTCAGCAACAA	424	19	60.3	47.4	서열번호 37
FIP(F1c+F2)	CAGCGGCAGCAAGAAAGCGTAAGTTACCGCGCTGAG		36			서열번호 38
BIP(B1c+B2)	CTGGACACACCCATCCGTTACGCCTGTTGTCAGATATTTTCC		43			서열번호 39
LoopF	CTTGAATGAGCTGCACAGTG	216	20	61.8	50	서열번호 40
LoopB	GTTCCGTGGTCACCCATC	304	18	62.5	61.1	서열번호 41
Product	GTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCACTGTG CAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCT GGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCTTGCTGGAC ACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGTTCC GTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAG GC		177	76.3	58.2	서열번호 42

[109] [표7]

NDM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	GGTTTGGCGATCTGGTTT	134	18	60.3	50	서열번호 43
B3	CCATCTTGTCCTGATGCG	379	18	60.3	55.6	서열번호 44
FIP(F1c+ F2)	ACCGTTGGAAGCGACTGCGAATGTCTGGCAGCAC AC		36			서열번호 45
BIP(B1c+ B2)	CGTGCTGGTGGTCGATACCATCTCCTGCTTGATCCA GT		38			서열번호 46
LoopF	CCGGCATGTCGAGATAGG	205	18	61.8	61.1	서열번호 47
LoopB	CTGGACCGATGACCAGAC	276	18	61.5	61.1	서열번호 48
Product	GAATGTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGC CGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGATC GTCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATA CCGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCCA TCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGAT		159	76.5	59.7	서열번호 49

[110] [표8]

NDM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-2

	프라이머	위치	길이	Tm	GC%	서열번호
F3	AAATGGAACTGGCGACC	113	18	60.3	50	서열번호 50
B3	CAGGTTGATCTCCTGCTTG	333	19	60.2	52.6	서열번호 51
FIP(F1c+ F2)	CGGCATGTCGAGATAGGAAGTGGGTTTGGCGATCT GGTTT		40			서열번호 52
BIP(B1c+ B2)	CGTGCTGGTGGTCGATACCTCCAGTTGAGGATCTG GG		37			서열번호 53
LoopF	CCAGACATTCGGTGCGAG	177	18	62.9	61.1	서열번호 54
LoopB	CTGGACCGATGACCAGAC	276	18	61.5	61.1	서열번호 55
Product	GGTTTGGCGATCTGGTTTCCGCCAGCTCGCACCG AATGTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGACATGCC GGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGATCG TCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTCGATAC CGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCCA AACTGGA		180	77.5	61.1	서열번호 56

[111]

[112] 1-2: 일반 PCR 및 실시간 PCR용 프라이머 제작

[113] 본 발명에서는 상기 실시예 1-1에서 제작한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트와 일반 PCR 및 실시간 PCR과 비교하여 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도 및 효율을 비교하기 위해 일반 PCR(Conventional PCR) 및 실시간 PCR(Real-time PCR) 수행을 위한 프라이머 세트도 각각 제조하였다. IMP 유전자 검출을 위한 실시간 PCR 프라이머 세트는 표 1의 F3 및 B3과 동일한

염기서열을 가진 프라이머를 사용하였다.

[114]

[115] [표9]

일반 PCR 프라이머 세트

타겟 유전자	프라이머		서열번호	Tm	길이
IMP	IMP-S	ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC	서열번호 57	56	587
	IMP-AS	ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC	서열번호 58		
VIM	VIM-DIA/F	CAG ATT GCC GAT GGT GTT TGG	서열번호 59	55	523
	VIM-DIA/R	AGG TGG GCC ATT CAG CCA GA	서열번호 60		
	VIM2'-S	ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG	서열번호 61	42	801
	VIM2'-AS	CTA CTC AAC GAC TGA GCG	서열번호 62		
KPC	KPC-F	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	서열번호 63	52	873
	KPC-R	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	서열번호 64		
NDM	KP5506 M13R3	CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG	서열번호 65	52	750
	KP5506 M13R2	ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA	서열번호 66		

[116] [표10]

실시간 PCR 프라이머 세트

타겟 유전자	프라이머		서열번호
IMP	F3	GGG CGT TGT TCC TAA ACA	서열번호 1
	B3	TTG TGG CTT GAA CCT TAC C	서열번호 2
VIM	VIM	CCG AGT GGT GAG TAT CCG AC	서열번호 67
	VIM	GAA TGC GTG GGA ATC TCG TTC	서열번호 68
KPC	KPC	GGC CGC CGT GCA ATA C	서열번호 69
	KPC	GCC GCC CAA CTC CTT CA	서열번호 70
NDM	NDM	GAC CGC CCA GAT CCT CAA	서열번호 71
	NDM	CGC GAC CGG CAG GTT	서열번호 72

[117]

[118] 실시예 2 : 카바페넴아제 생성 장내세균 검출

[119] 2-1 : DNA 추출

[120] 본 발명에서는 상기 실시예 1에서 제작한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 일반 PCR 프라이머 세트 및 실시간 PCR 프라이머 세트를 이용하여 카바페넴아제 생성 장내세균을 검출하고자 하였다. 시료는 직장면봉법(rectal swab)을 이용하여 수득하였으며, 시료에서 분리한 카바페넴아제 생성 장내세균을 맥콘키배지(MacConkey agar)에 접종 후 37°C에서 하룻밤(over night) 동안 배양하였다. 배양한 균주를 탁도계를 사용하여 1.5×10^8 개 세포(MaF 0.5)가 되도록 맞춘 다음, 1.5ml 튜브에 옮겨 준 뒤, 100 °C에서 10분간 끓이고, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후, DNA가 포함된 상층액을 수득하였다. 수득한 1.5×10^8 개 세포에 대한 DNA는 1.5×10 까지 연속 희석하여 준비하였다. 표 11에 나타낸 바와 같이, 상기 시료에서 IMP, VIM, KPC 및 NDM

유전자를 발현하는 각각의 장내세균을 분리하였으며, 카바페넴아제 생성 유전자 각각에 대한 양성대조균을 사용하였다.

[121]

[122] [표11]

시료에서 분리한 장내세균 및 양성 대조균

	샘플 번호	균주명
IMP	1	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	2.	대장균(<i>Escherichia coli</i>)
	3.	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	양성 대조균 (NCCP16085)	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
VIP	1	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	2	시트로박터 프룬디(<i>Citrobacter freundii</i>)
	3	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	4	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	5	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	6	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	양성 대조균 (NCCP16086)	녹농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
KPC	1	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	2	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	3	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	4	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	5	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
	양성 대조균 (NCCP16052)	폐렴간균(<i>Klebsiella pneumonia</i>)
NDM	1	아시네토박터 바우마니(<i>Acinetobacter baumannii</i>)
	2	모르가넬라모르가니(<i>Morganella morganii</i>)
	3	대장균(<i>Escherichia coli</i>)
	4	대장균(<i>Escherichia coli</i>)
	5	대장균(<i>Escherichia coli</i>)
	양성 대조균 (NCCP 16046)	대장균(<i>Escherichia coli</i>)

[123] 2-2: 검출 방법 및 프라이머 종류에 따른 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도 및 효율 비교

[124] 본 발명에서는 상기 실시예 2-1에서 분리한 DNA를 주형으로 하여 상기 실시예 1에서 제작한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 일반 PCR 프라이머 세트 및 실시간 PCR 프라이머 세트를 이용하여 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 확인하였다.

[125] 먼저, 일반 PCR은 바이오니어 프리믹스 PCR 튜브(Bioneer premix PCR tube; BIONEER AccuPower PCR PreMix, K-2016-C)를 준비하고, 제품 메뉴얼에 따라, 표 9의 각 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 DNA를 증폭하였다. DNA 증폭을 위해 1X 반응 완충액(Reaction Buffer; with 1.5mM MgCl₂), dNTP 각각 250μM, DNA 중합효소(*TopDNA* polymerase)1U이 동결 건조되어 들어있는

프리믹스 PCR 튜브에 10 pmole 프라이머 각각 1 μ l와 멸균 3차 증류수 16 μ l 및 실시예 2-1 DNA 2 μ l 로 구성되는 20 μ l의 PCR 반응액을 제조하였으며, 94°C에서 5분 1 사이클 반응 후에 94°C에서 30초, IMP 유전자는 56°C, VIM 유전자는 42°C, KPC, NDM 유전자는 52°C에서 45초, 72°C 1분 처리를 1 사이클로 하여 반복수행하였다. IMP, VIM 유전자는 35 사이클, KPC, NDM 유전자는 30 사이클로 PCR을 수행한 다음, 증폭된 각각의 증폭산물은 1.5% 아가로스겔을 이용하여 전기영동(120V / 35 분)하여 증폭 여부를 확인하였다.

[126]

[127] 실시간 PCR은 바이오래드(Bio-rad)사의 키트(Bio-rad SsoAdvanced Universal SYBR Green supermix kit; 172-5271)를 사용하여 제품 메뉴얼에 따라 실시간 PCR 분석 기기(Bio-rad CFX connect Real-time system; 788BR06588)를 사용하여 분석하였으며, 표 10의 각 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하였다. DNA 증폭을 위해 2X 수퍼프리믹스 10 μ l (polymerase, dNTP, MgCl₂, SYBR Green 1 dye가 포함되어 있음), 10 pmole 프라이머 각각 1 μ l와 멸균 3차 증류수 6 μ l 및 실시예 2-1 DNA 2 μ l 로 구성되는 20 μ l의 PCR 반응액을 제조하였으며, 98°C에서 3분 반응 후에 98°C에서 10초, 60°C에서 30초 처리를 1 사이클로 하여, 40사이클을 수행하였다

[128]

[129] 루프 매개 등온증폭 반응은 NEB LAMP 키트(WarmStart LAMP kit; E1700L)를 사용하여 제품 메뉴얼에 따라 수행하였으며, 실시간 PCR 분석 기기(Bio-rad CFX connect Real-time system; 788BR06588)를 사용하여 분석를 사용하였다. 표 1 내지 표 8의 각 유전자에 대한 프라이머 세트를 사용하여 DNA를 증폭하였으며, 표 12와 같이 반응용액을 제조하여 65 °C에서 60분 동안 증폭 반응을 수행하였다.

[130]

[131] [표12]

루프 매개 등온증폭 반응 조성물

	첨가량(μl)
WarmStart LAMP 2X Master Mix	12.5 μl
LAMP Primers (10X) -F3 primer (0.2 μM /1X concentration) -B3 primer (0.2 μM /1X concentration) -FIP primer (1.6 μM /1X concentration) -BIP primer (1.6 μM /1X concentration) -LoopF primer (0.4 μM /1X concentration) -LoopB primer (0.4 μM /1X concentration)	2.5 μl
LAMP Fluorescent Dye	0.5 μl
template	2 μl
멸균증류수	7.5 μl
최종 용량	25 μl

[132] 그 결과, 도 2 내지 도 5에 나타난 바와 같이, 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 일반 PCR과 유사한 민감도를 보이는 것을 확인하였다. 또한, 2개의 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트 간의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도를 확인한 결과, 표 1, 표 3, 표 5 및 표 7에 해당하는 프라이머 세트가 표 2, 표 4, 표 6 및 표 8에 해당하는 프라이머 세트보다 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도가 높은 것을 확인하였다. 즉, 프라이머 서열에 따라 검출 민감도가 큰 차이를 보이는 것을 확인하였으며, 본 발명에서는 검출 민감도가 높은 표 1, 표 3, 표 5 및 표 7에 해당하는 프라이머 세트와 일반 PCR 및 실시간 PCR 분석 민감도를 하기 표 13과 같이 정리하였다.

[133]

[134] [표13]

검출 방법 및 프라이머 종류에 따른 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 민감도

Target	LAMP		qPCR		cPCR
	농도	Ct	농도	Ct	농도
IMP	10 ³	20.39	10 ²	35.31	10 ⁴
	10 ⁵	38.61	10 ⁴	36.24	10 ⁵
	10 ³	20.67	10 ²	35.16	10 ⁴
	10 ³	26.56	10 ²	35.57	10 ⁴
VIM	10 ⁴	17.08	10 ²	37.37	10 ⁴
	10 ⁴	18.32	10 ²	38.17	10 ²
	10 ⁴	16.18	10 ²	38.19	10 ⁷
	10 ⁴	17.58	10 ²	39.27	10 ⁷
	10 ³	18.1	10 ³	37.41	10 ⁵
	10 ⁴	25.88	10 ²	38.06	10 ⁴
	10 ⁴	18.86	10 ²	38.08	10 ⁴
KPC	10 ⁴	29.19	10 ²	39.61	10 ⁷
	10 ³	32.35	10 ³	38.99	10 ⁵
	10 ³	29.31	10 ²	38.64	10 ⁵
	10 ³	33.09	10 ¹	39.15	10 ⁵
	10 ³	34.51	10 ²	39.3	10 ⁵
	10 ³	31.69	10 ²	39.14	10 ⁵
NDM	10 ⁴	24	10 ²	35.36	10 ⁶
	10 ³	27.16	10 ²	38.03	10 ⁴
	10 ³	22.55	10 ³	36.82	10 ⁵
	10 ⁴	21.53	10 ³	37.23	10 ⁵
	10 ⁴	21.53	10 ³	37.23	10 ⁵
	10 ⁴	23.35	10 ³	36.93	10 ⁵

[135] 상기 결과를 바탕으로 본 발명에서는 IMP 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1, VIM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1, KPC 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1 및 NDM 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트-1이 카바페넴아제 생성 장내세균 검출에 적합한 것을 확인하였다.

[136]

[137] 실시예 3: 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트의 특이도 확인

[138] 본 발명에서는 실시예 2에서 효과를 확인한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트가 실제로 카바페넴아제 생성 장내세균만을 특이적으로 검출할 수 있는지 확인하고자 다양한 종류의 일반 균주, 카바페넴 내성 장내세균(carbapenem resistant enterobacteriaceae; CRE), ESBL(Extended-spectrum beta-lactamases) 및 비-ESBL(non Extended-spectrum beta-lactamases)을 이용하여 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 루프 매개 등온증폭 반응을 수행하였다.

상기 균주는 실시예 2-1과 동일한 방법으로 수득하여, 각각의 항생제 내성 특징을 파악하여 카바페넴 내성 장내세균, ESBL 및 비-ESBL으로 분류를 하였다. 양성 대조균으로는 상기 표 11에 나타난 양성대조균을 각각 사용하였다.

[139]

[140] [표14]

다양한 종류의 균주

구분	번호	균종	비고
ATCC	1	<i>E. coli</i>	ATCC25922
ATCC	2	<i>K. pneumoniae</i>	ATCC700603
CRE	1	<i>E. coli</i>	
CRE	2	<i>E. aerogenes</i>	AmpC
CRE	3	<i>E. aerogenes</i>	AmpC
CRE	4	<i>K. pneumoniae</i>	AmpC
CRE	5	<i>K. pneumoniae</i>	AmpC
CRE	6	<i>E. amnigenus 2</i>	
CRE	7	<i>E. amnigenus 2</i>	
ESBL	ESBL_1	<i>E. coli</i>	CTX-M-group 9
ESBL	ESBL_2	<i>E. coli</i>	CTX-M-group 9
ESBL	ESBL_3	<i>E. coli</i>	CTX-M-group 1
ESBL	ESBL_4	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-group 1
ESBL	ESBL_5	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-group 1
ESBL	ESBL_6	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-group 1
ESBL	ESBL_7	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-group 1
Non ESBL	N_ESBL_1	<i>E. coli</i>	
Non ESBL	N_ESBL_2	<i>E. coli</i>	
Non ESBL	N_ESBL_3	<i>E. coli</i>	
Non ESBL	N_ESBL_4	<i>K. pneumoniae</i>	
Non ESBL	N_ESBL_5	<i>K. pneumoniae</i>	
Non ESBL	N_ESBL_6	<i>K. pneumoniae</i>	

[141] 도 6에 나타난 바와 같이, 양성 대조균에서만 반응이 나타났으며, 카바페넴아제 생성 장내세균이 아닌 카바페넴 내성 균주 및 다른 베타락탐계 항생제 내성 균주에서는 반응이 전혀 없는 것을 확인하였다.

[142] 즉, 본 발명의 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 카바페넴아제 생성 장내세균만을 선별적으로 검출할 수 있는 것을 확인하였다.

[143]

산업상 이용가능성

[144] 본 발명은 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트는 간단한 장비만 가지고도 1시간 내에 검사를 수행할 수 있는 것을 확인하였으며, 효과적으로 카바페넴아제 생성 장내세균을 검출하는

것을 확인하였으므로, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 진단 키트로 유용하게 사용할 수 있다.

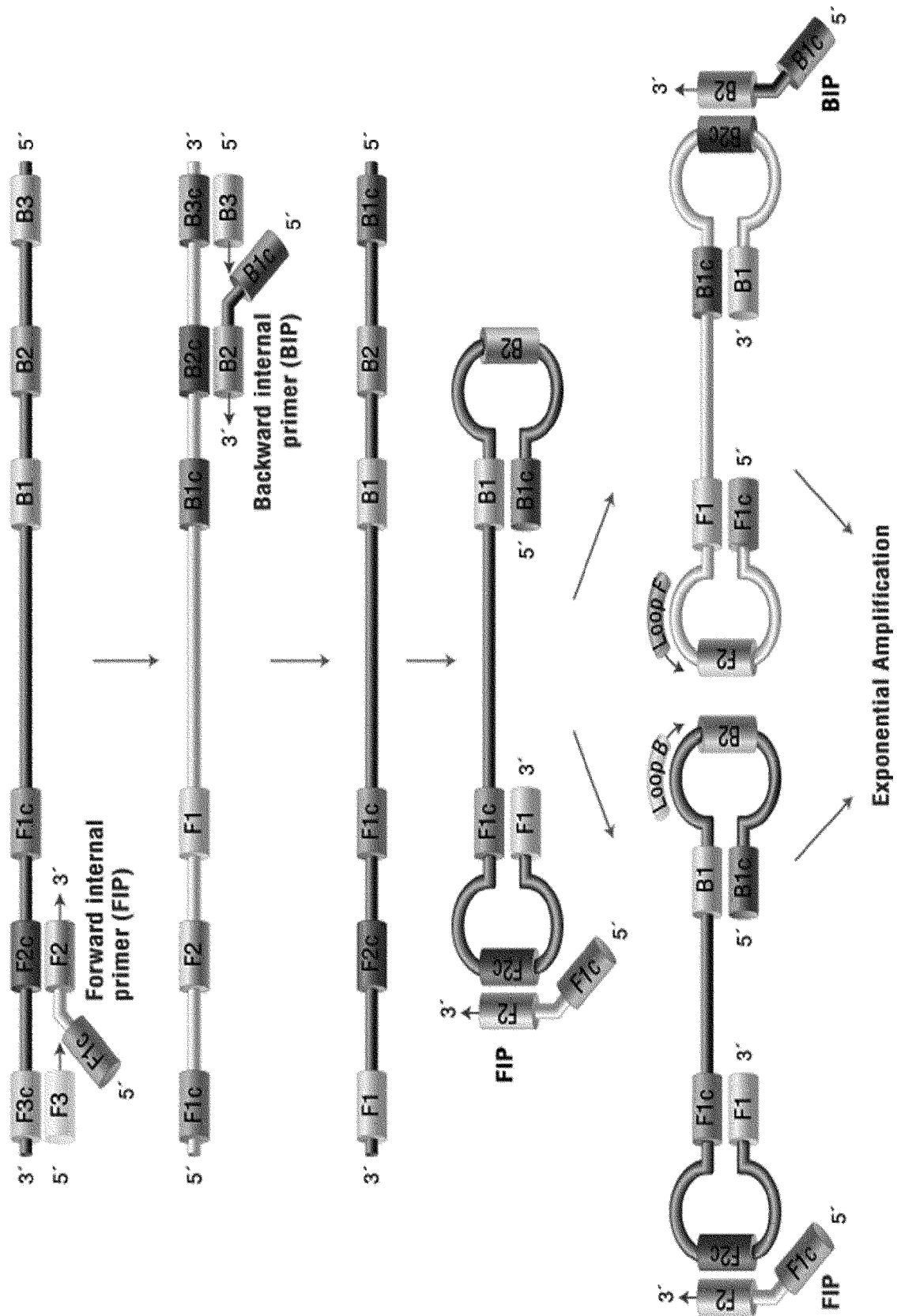
청구범위

- [청구항 1] (1) 서열번호 1 내지 서열번호 6의 염기서열로 구성되는 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트;
(2) 서열번호 15 내지 서열번호 20의 염기서열로 구성되는 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트;
(3) 서열번호 29 내지 서열번호 34의 염기서열로 구성되는 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트; 및
(4) 서열번호 43 내지 서열번호 48의 염기서열로 구성되는 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트; 중 어느 하나 이상의 프라이머 세트에 구성되는, 카바페넴아제 생성 장내세균(carbapenemase producing enterobacteriaceae; CPE) 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)용 프라이머 세트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 IMP 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 2의 역방향 프라이머, 서열번호 3의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 4의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 5의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 6의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 VIM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 15의 정방향 프라이머, 서열번호 16의 역방향 프라이머, 서열번호 17의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 18의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 19의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 20의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 KPC 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 29의 정방향 프라이머, 서열번호 30의 역방향 프라이머, 서열번호 31의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 32의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 33의 정방향 루프 프라이머(LoopF) 및 서열번호 34의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 NDM 유전자 검출용 프라이머 세트는 서열번호 43의 정방향 프라이머, 서열번호 44의 역방향 프라이머, 서열번호 45의 정방향 내부 프라이머(Forward inner primer; FIP), 서열번호 46의 역방향 내부 프라이머(Back inner primer; BIP), 서열번호 47의 정방향 루프

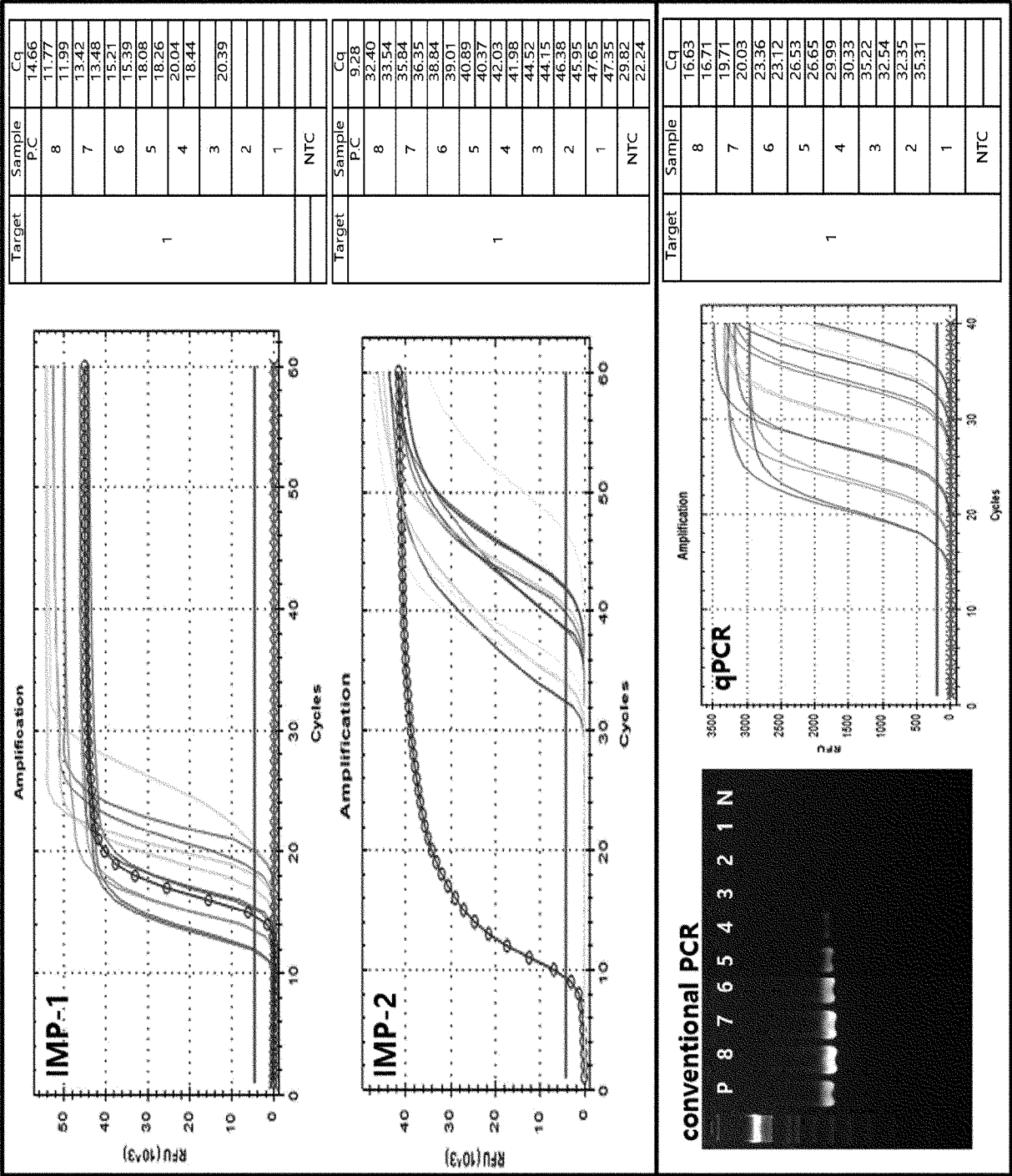
프라이머(LoopF) 및 서열번호 48의 역방향 루프 프라이머(LoopB)로 구성되는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트.

- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 카바페넴아제 생성 장내세균은 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumonia*), 슈도모나스균(*Pseudomonas spp.*), 세라티아균(*Serratia spp.*), 시트로박터균(*Citrobacter spp.*), 아시네토박터균(*Acinetobacter spp.*), 모르가넬라균(*Morganella spp.*), 프로비덴시아균(*Providencia spp.*) 및 엔테로박터균(*Enterobacter spp.*)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트.
- [청구항 7] 제1항의 카바페넴아제 생성 장내세균 검출을 위한 루프 매개 등온증폭 반응용 프라이머 세트를 포함하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 키트는 루프 매개 등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출용 키트.
- [청구항 9] 제1항에 따른 루프 매개 등온증폭용 프라이머 세트를 이용하여 카바페넴아제 생성 유전자를 증폭시키는 단계를 포함하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 증폭 반응은 60°C 내지 70°C에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 카바페넴아제 생성 장내세균 검출 방법.

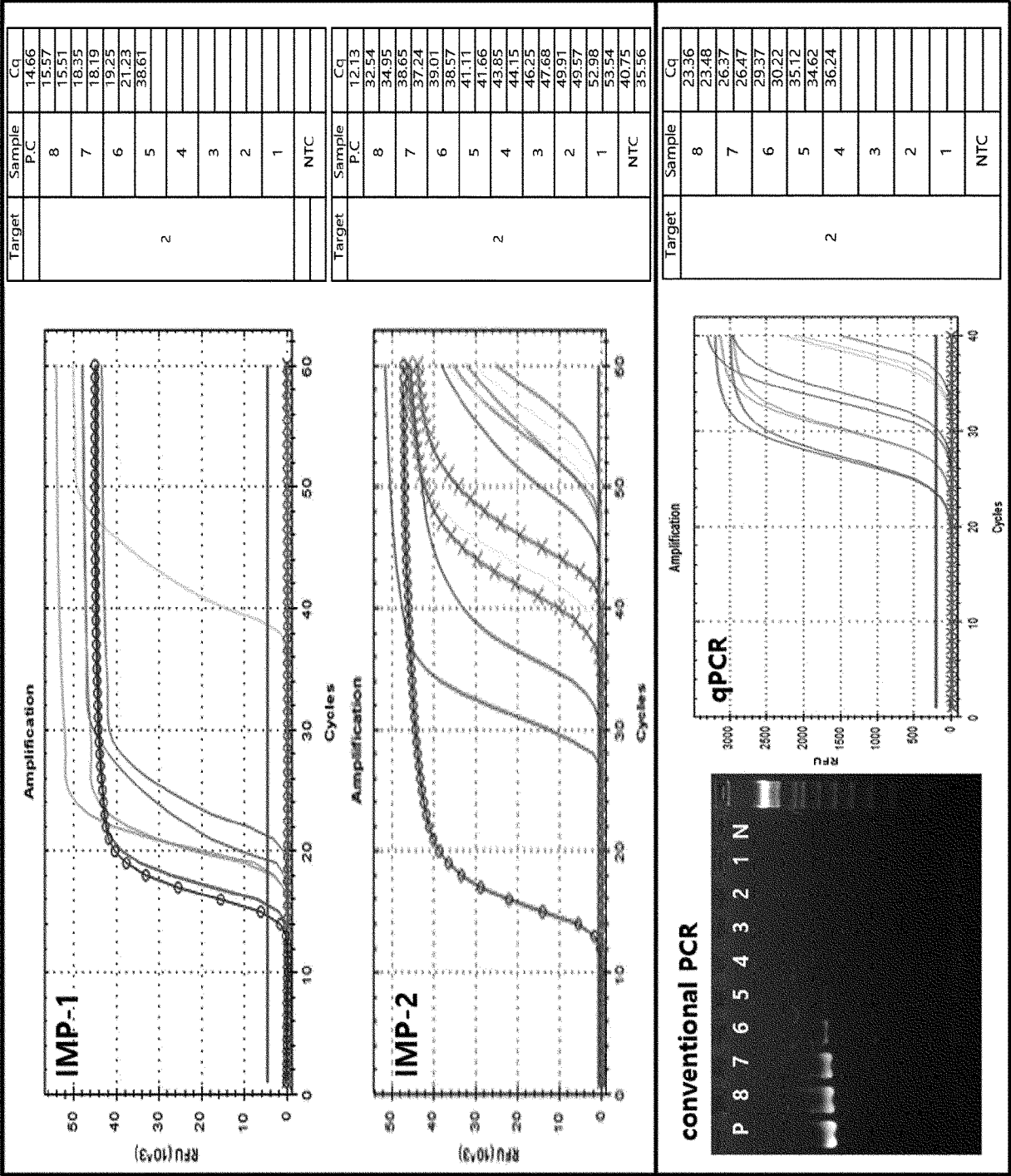
[Figure 1]



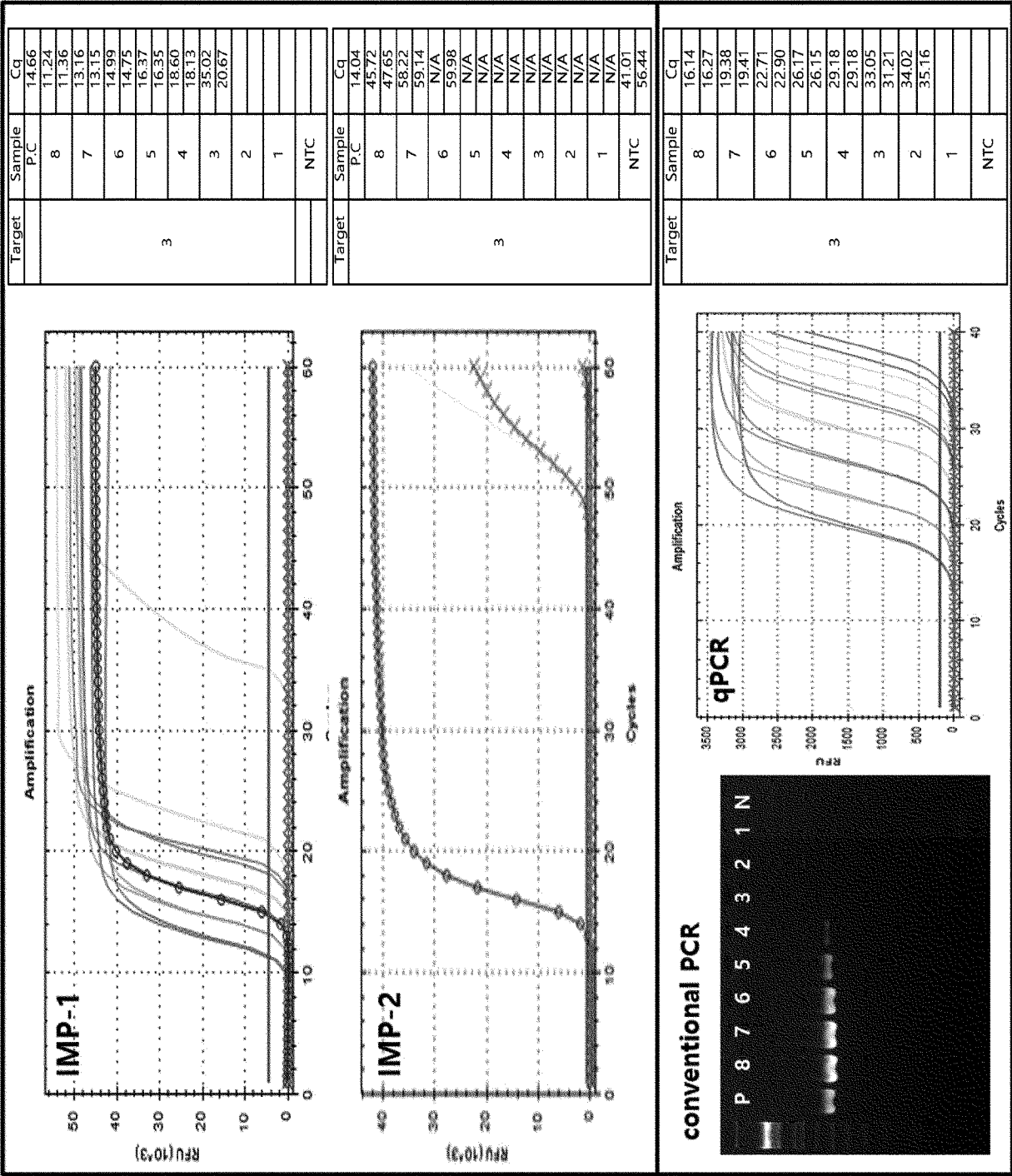
[도2a]



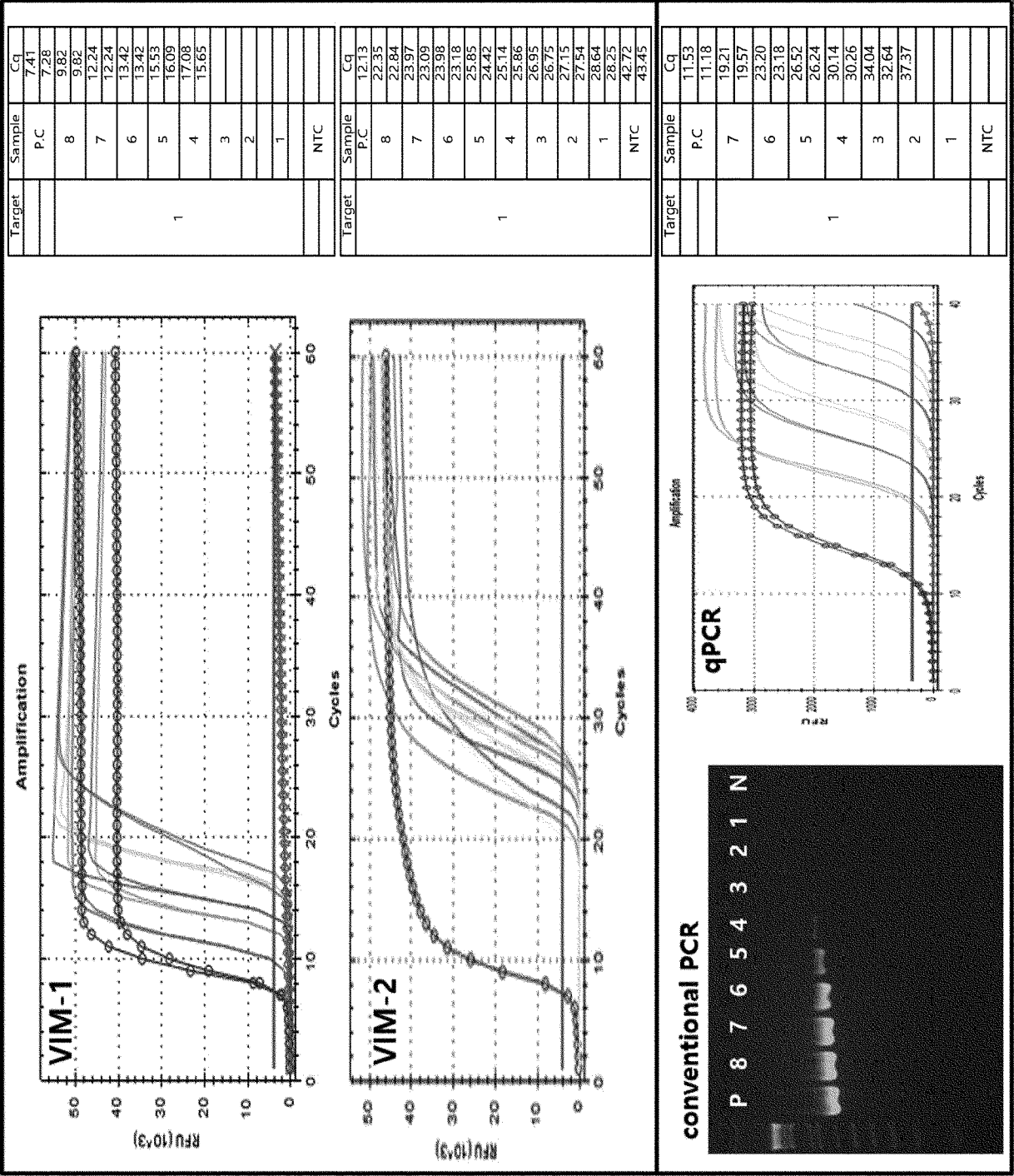
[도2b]



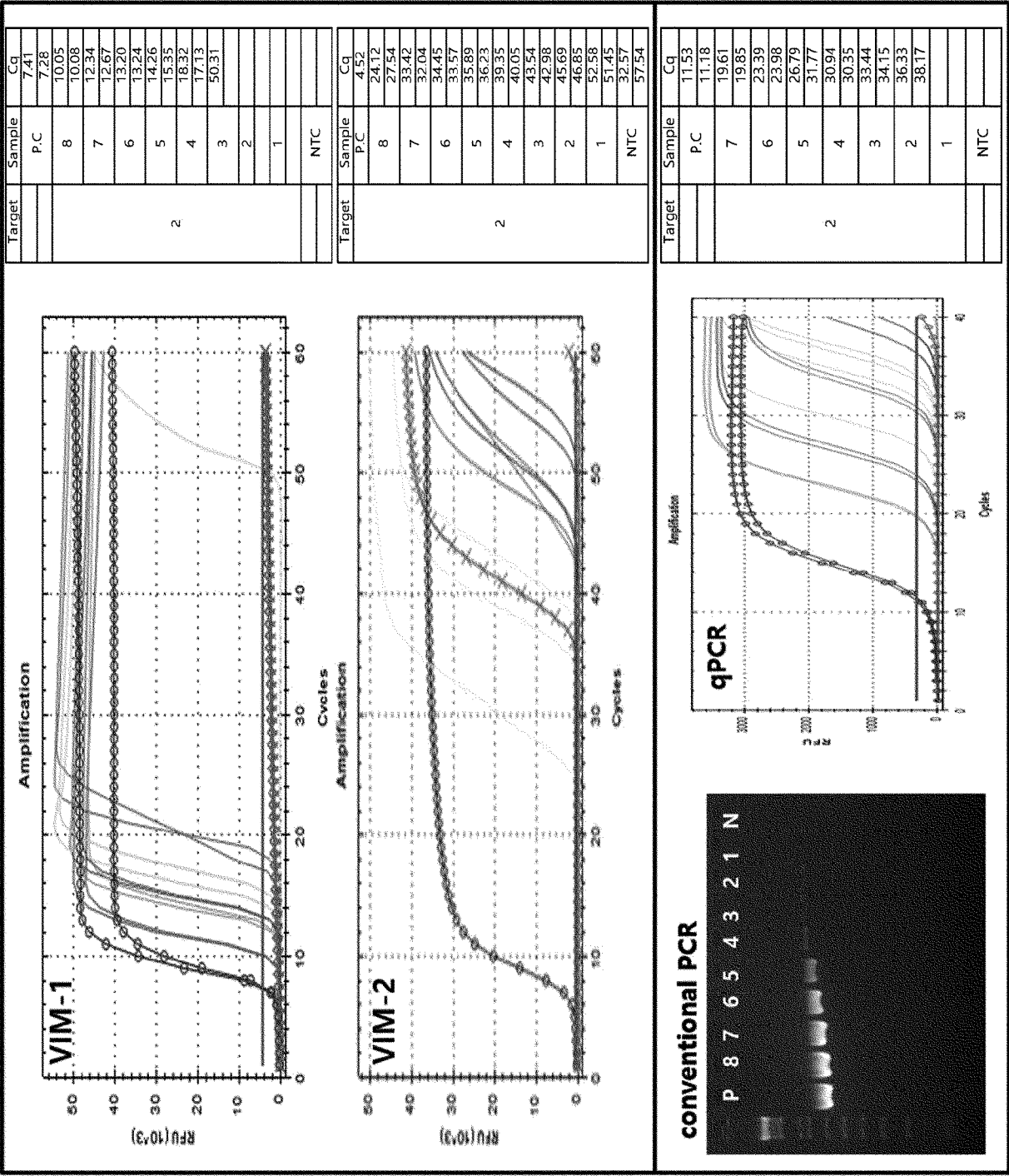
[도2c]



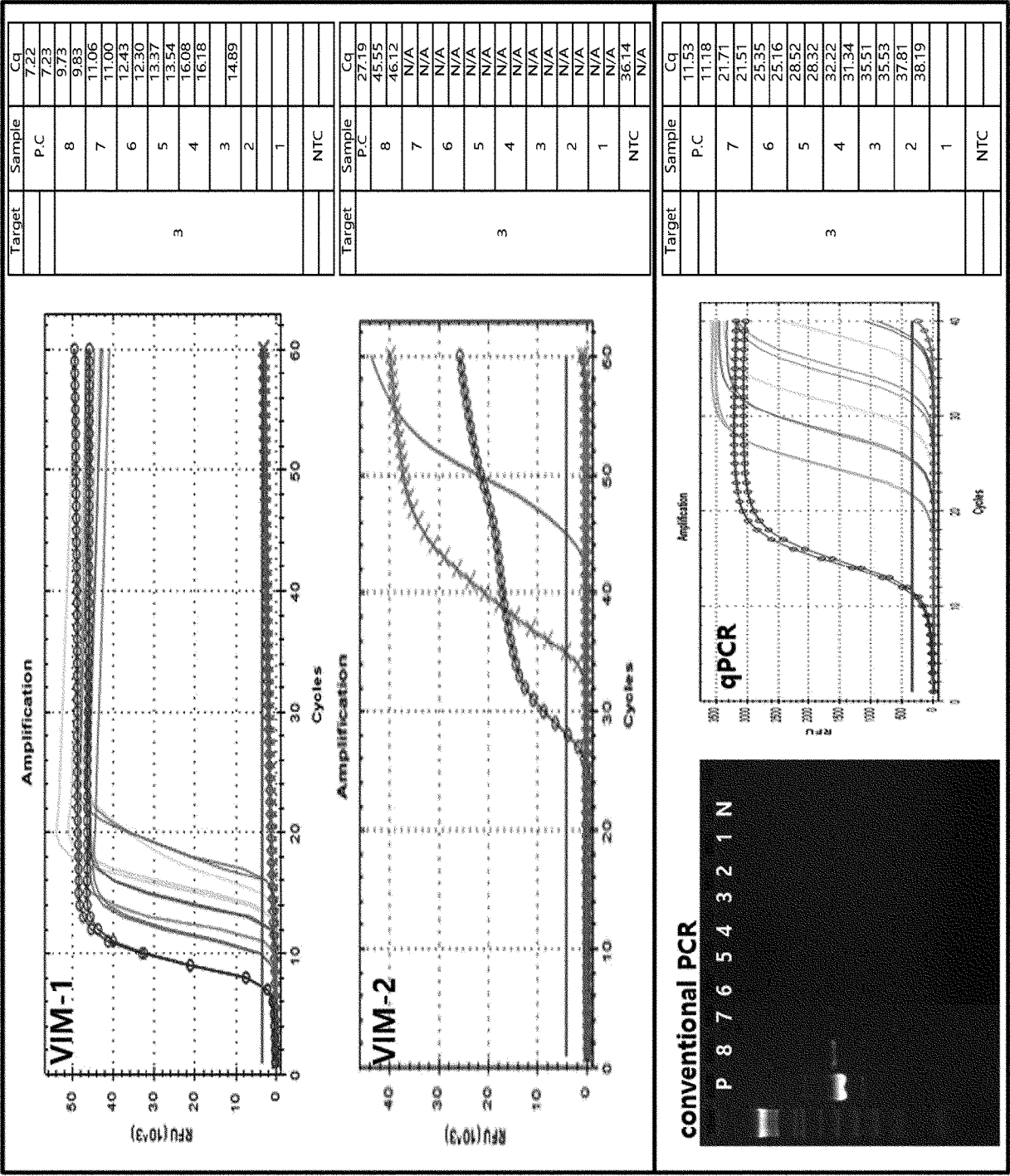
[도3a]



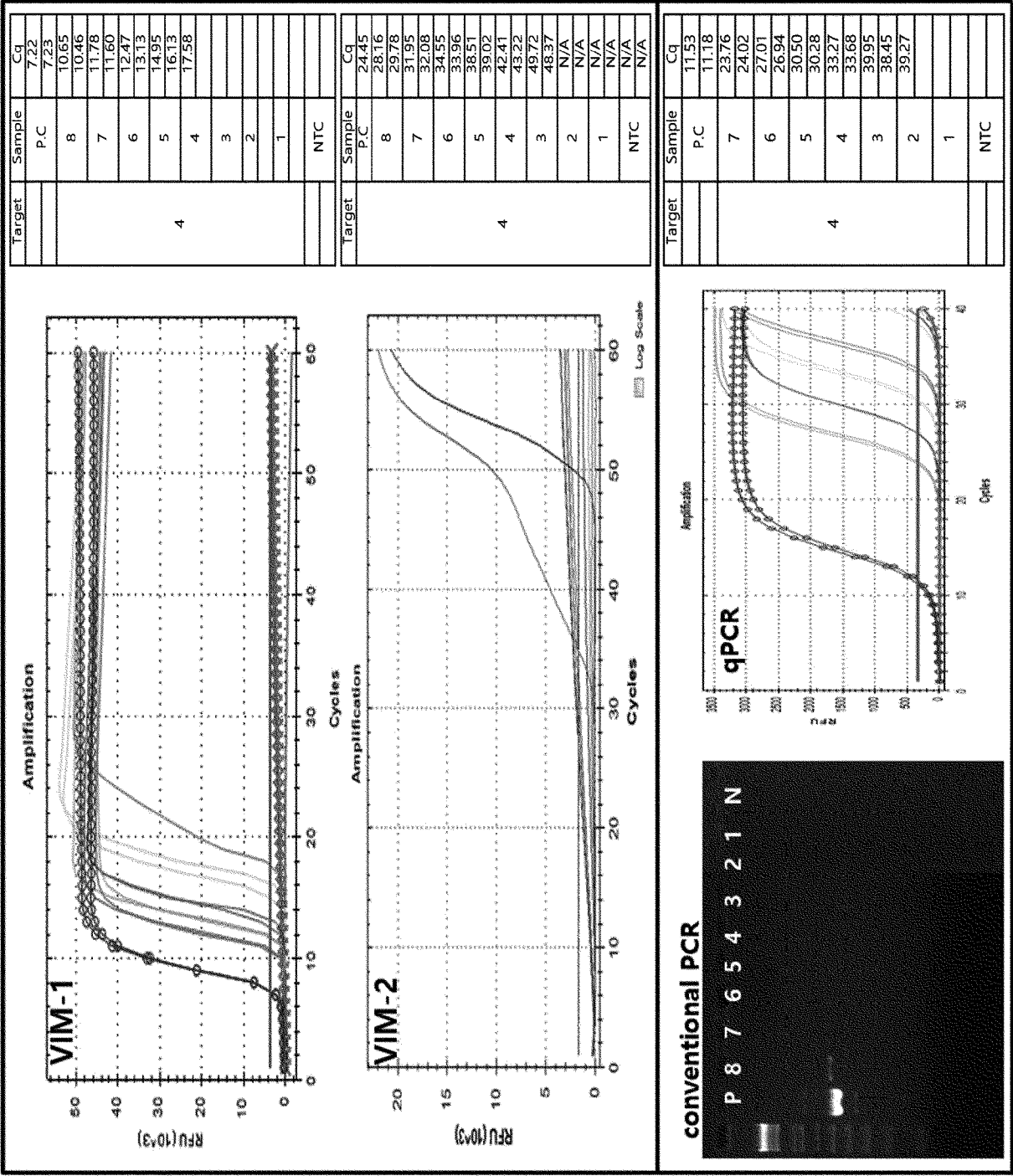
[도3b]



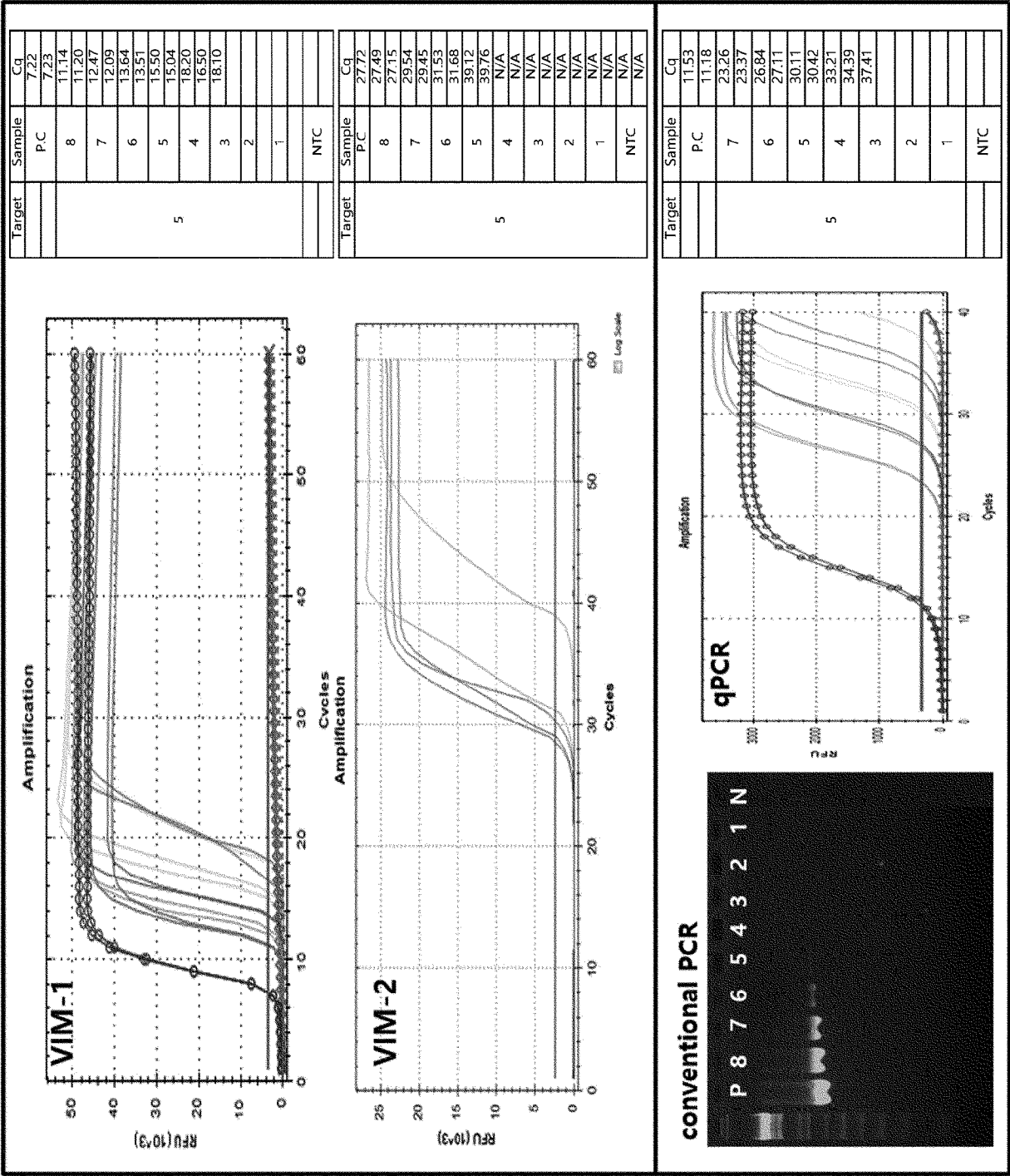
[도3c]



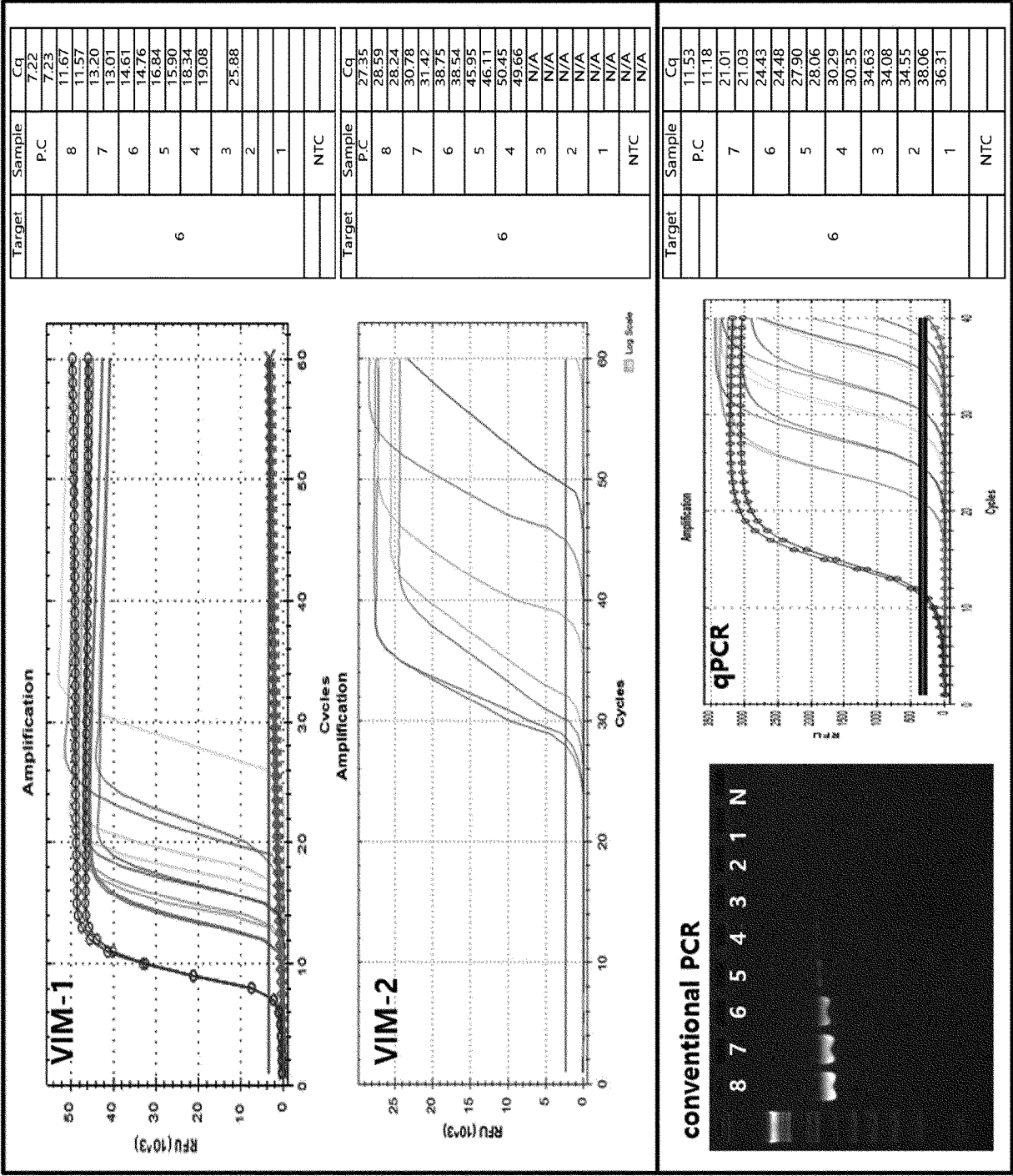
[도3d]



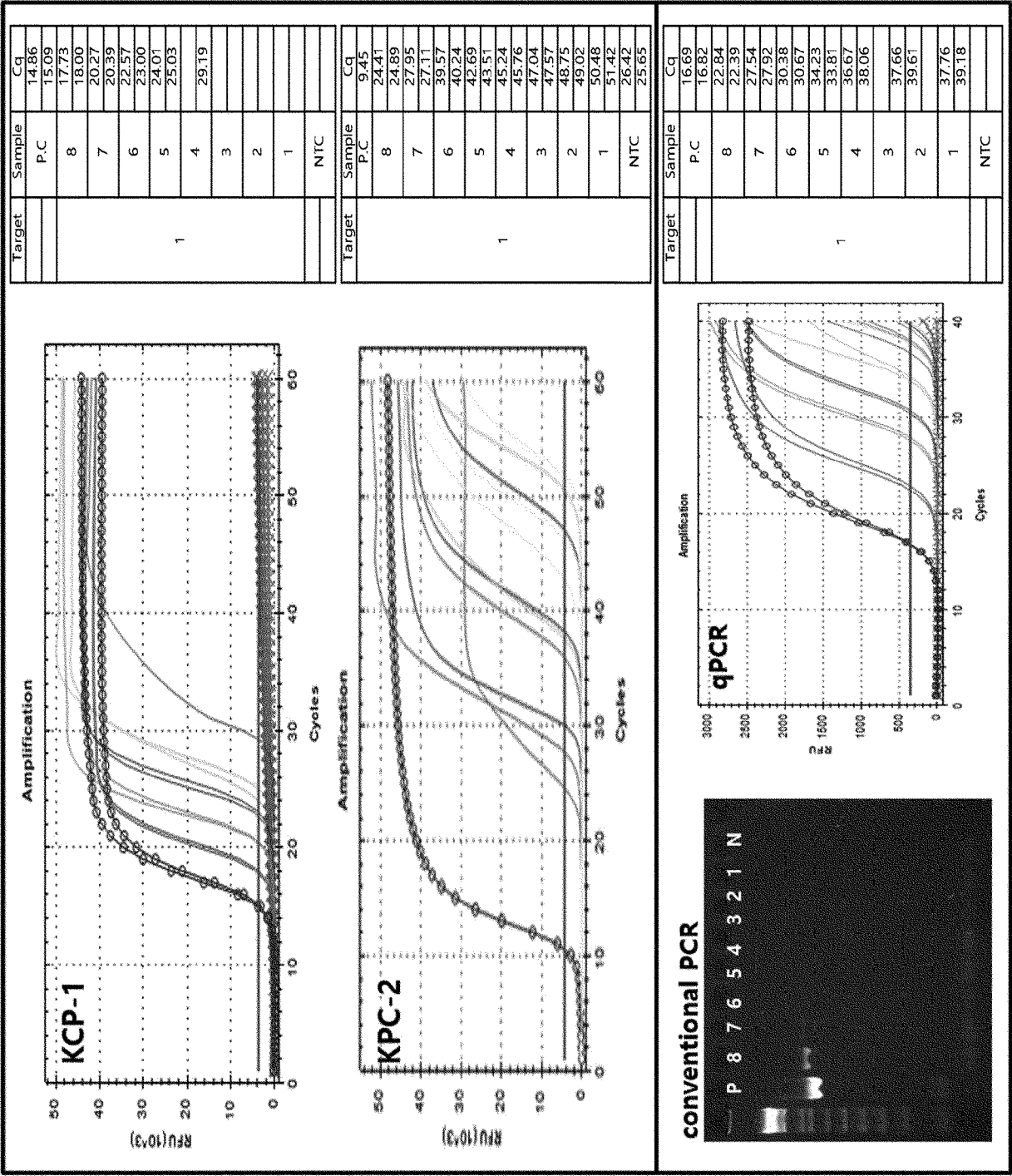
[도3e]



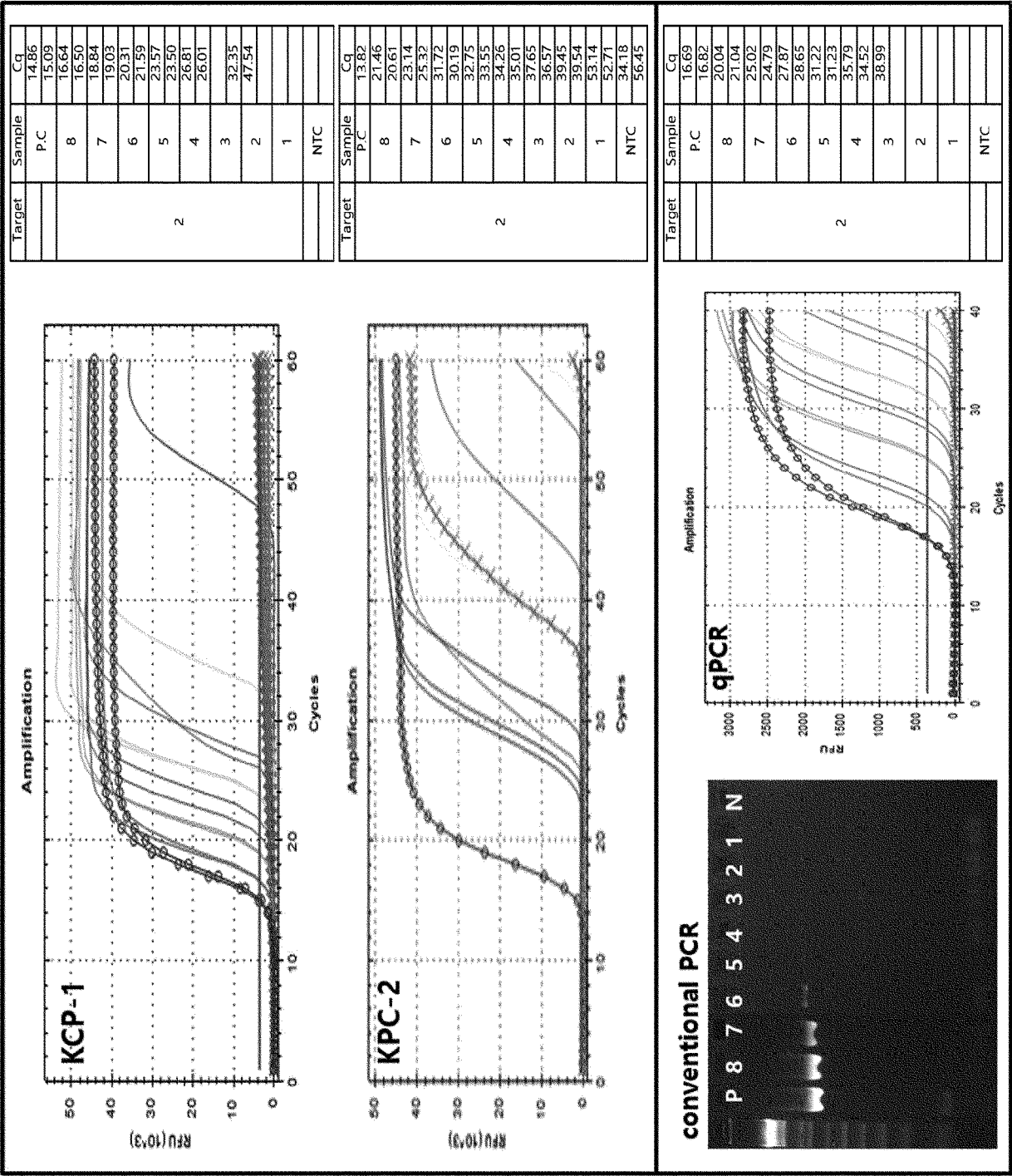
[도3f]



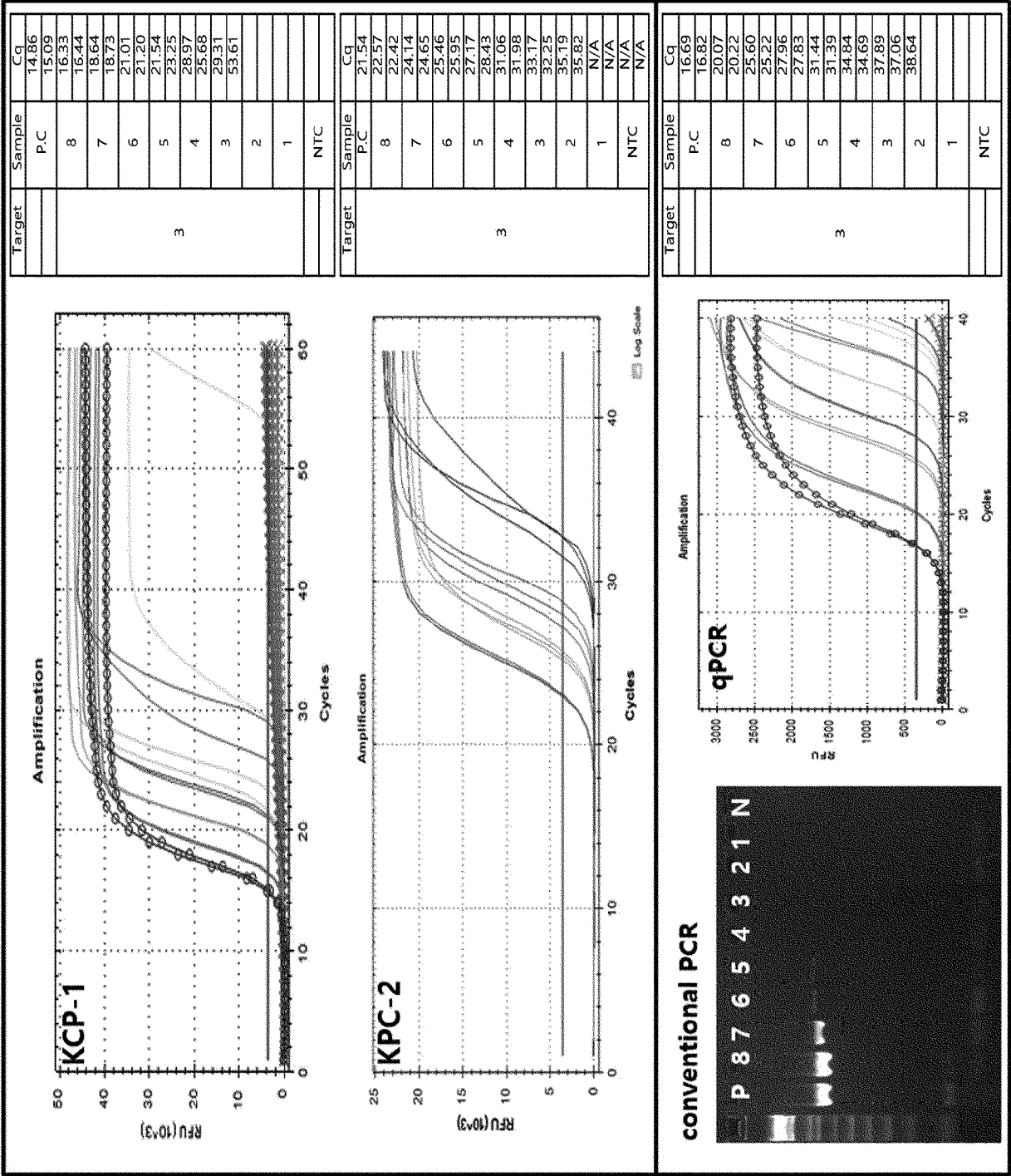
[도4a]



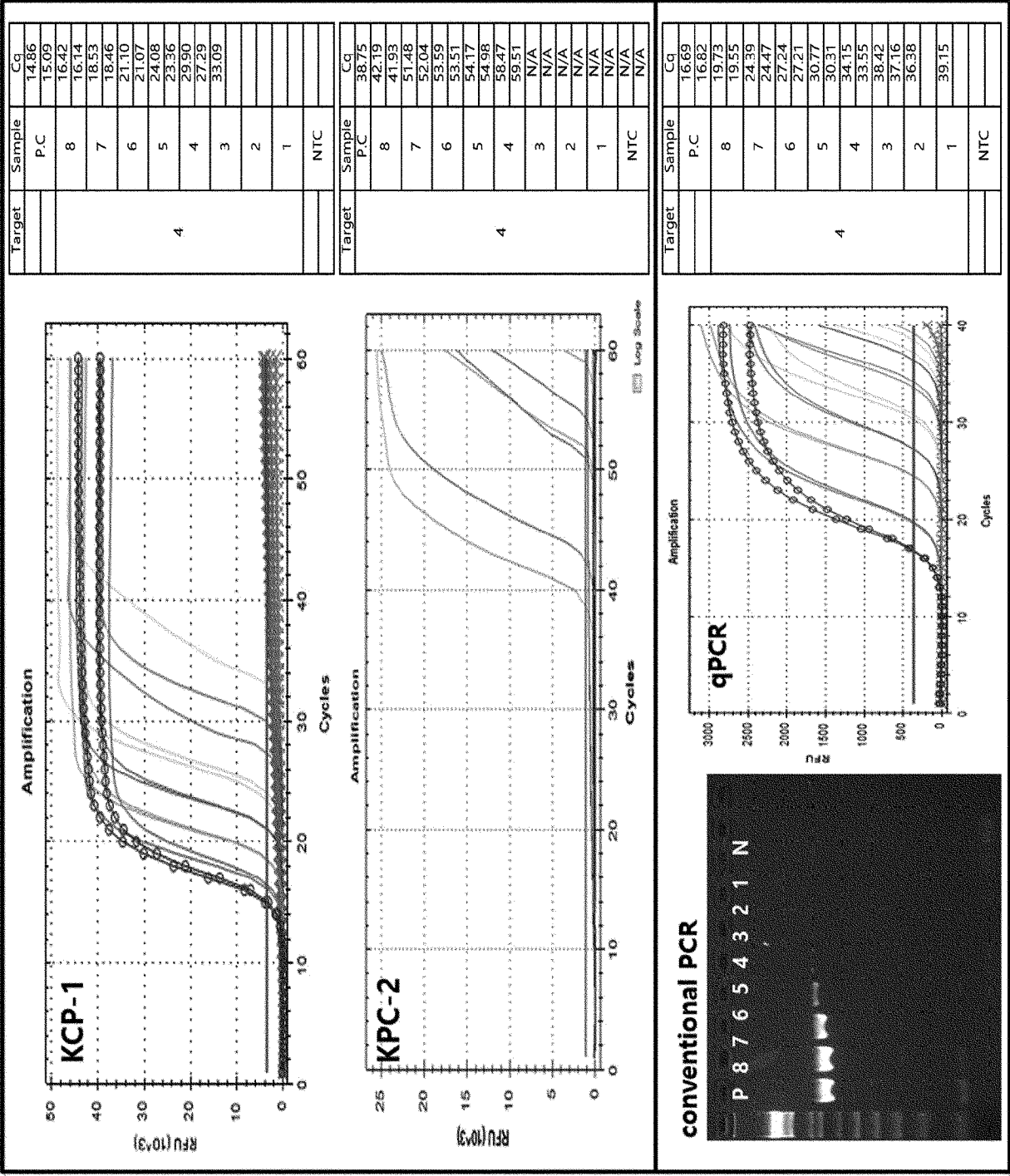
[도4b]



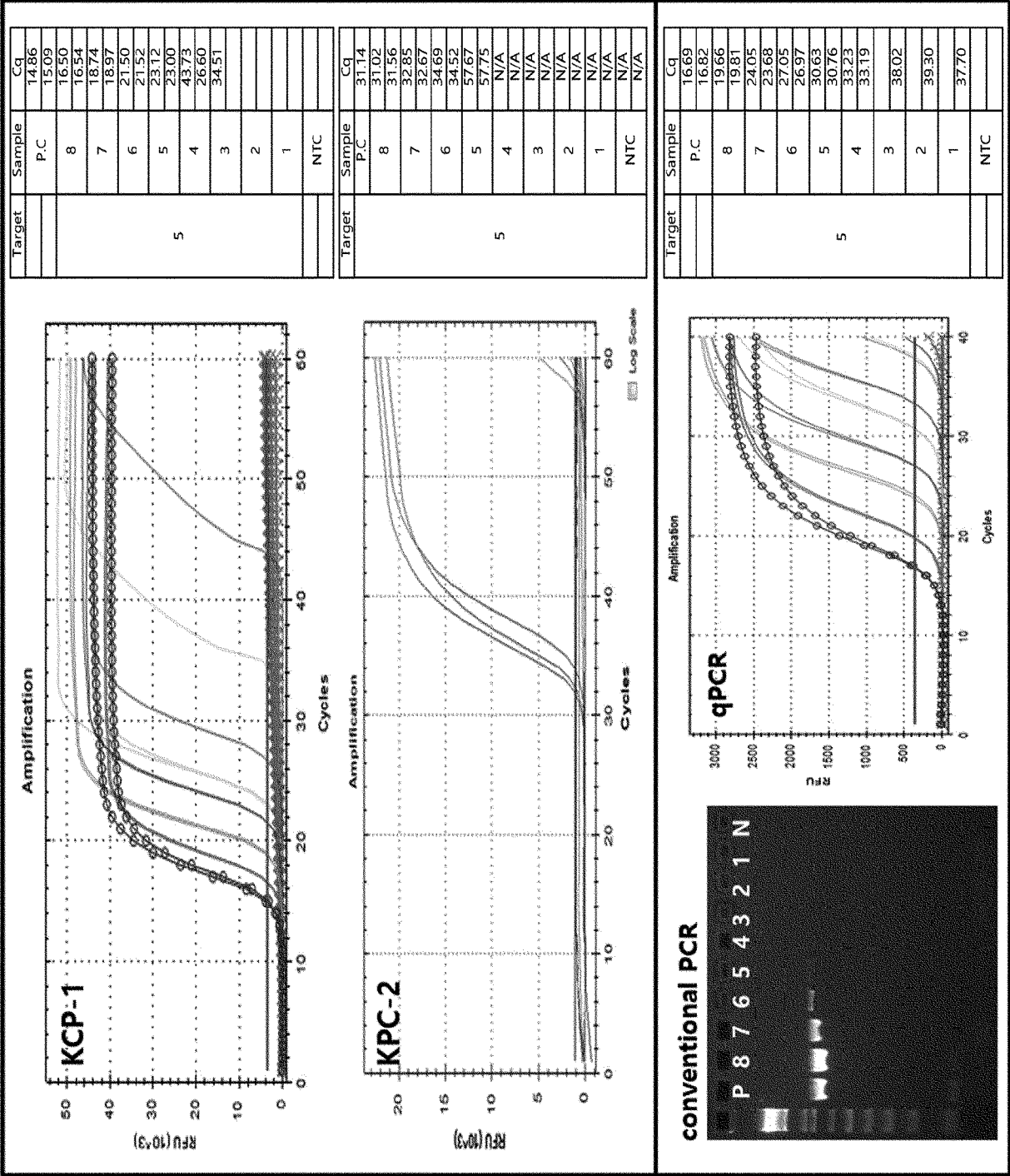
[도4c]



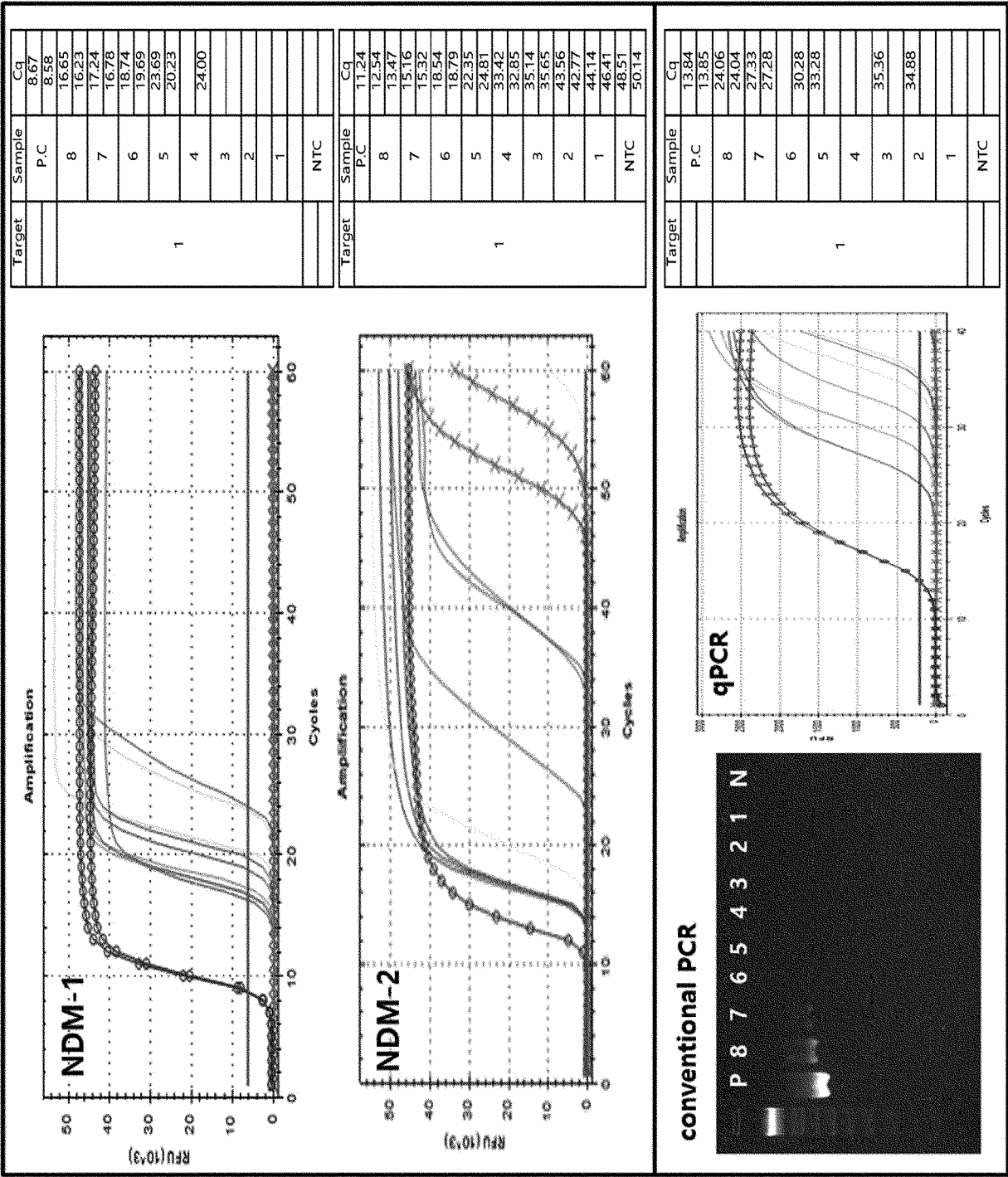
[도4d]



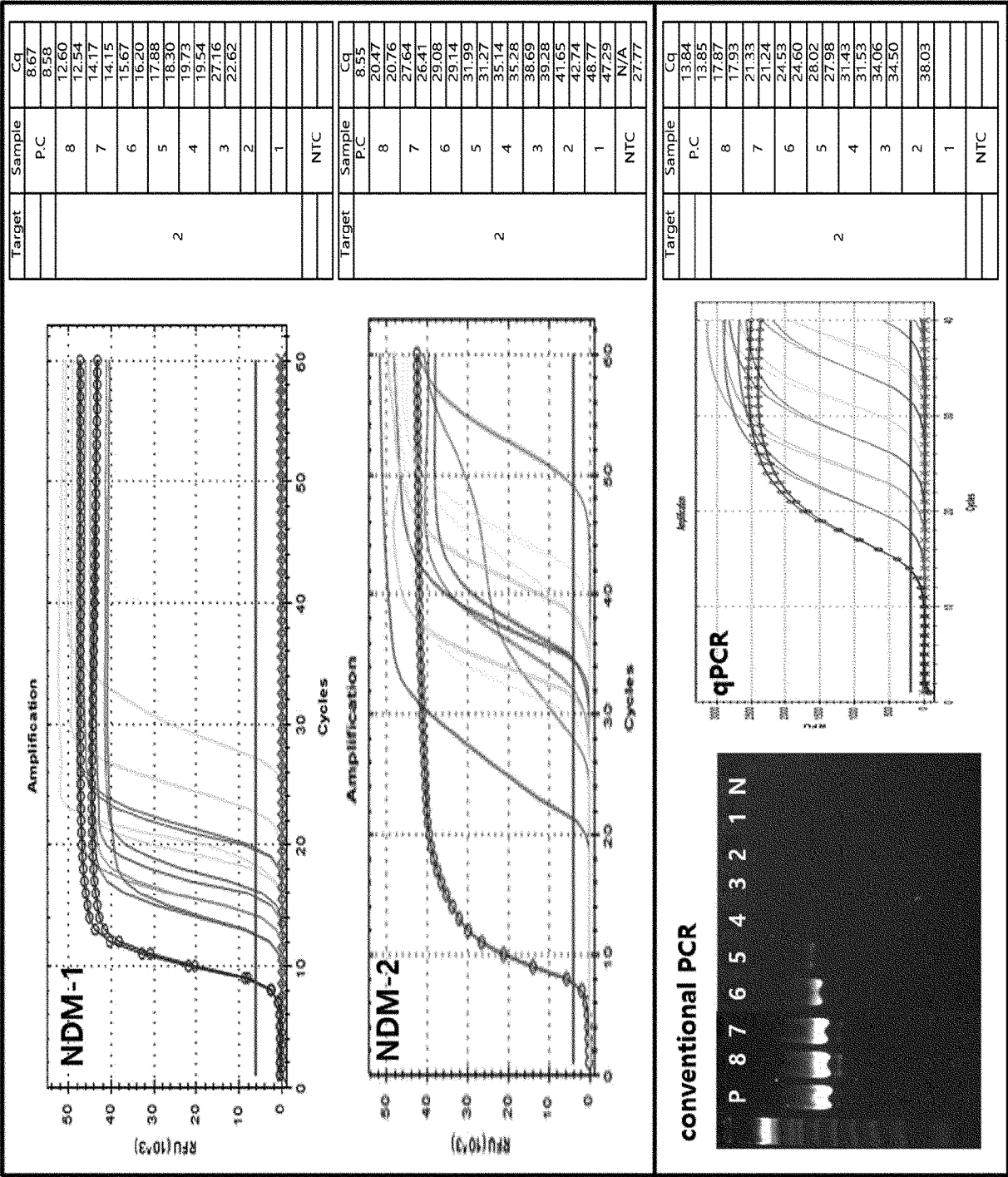
[도4e]



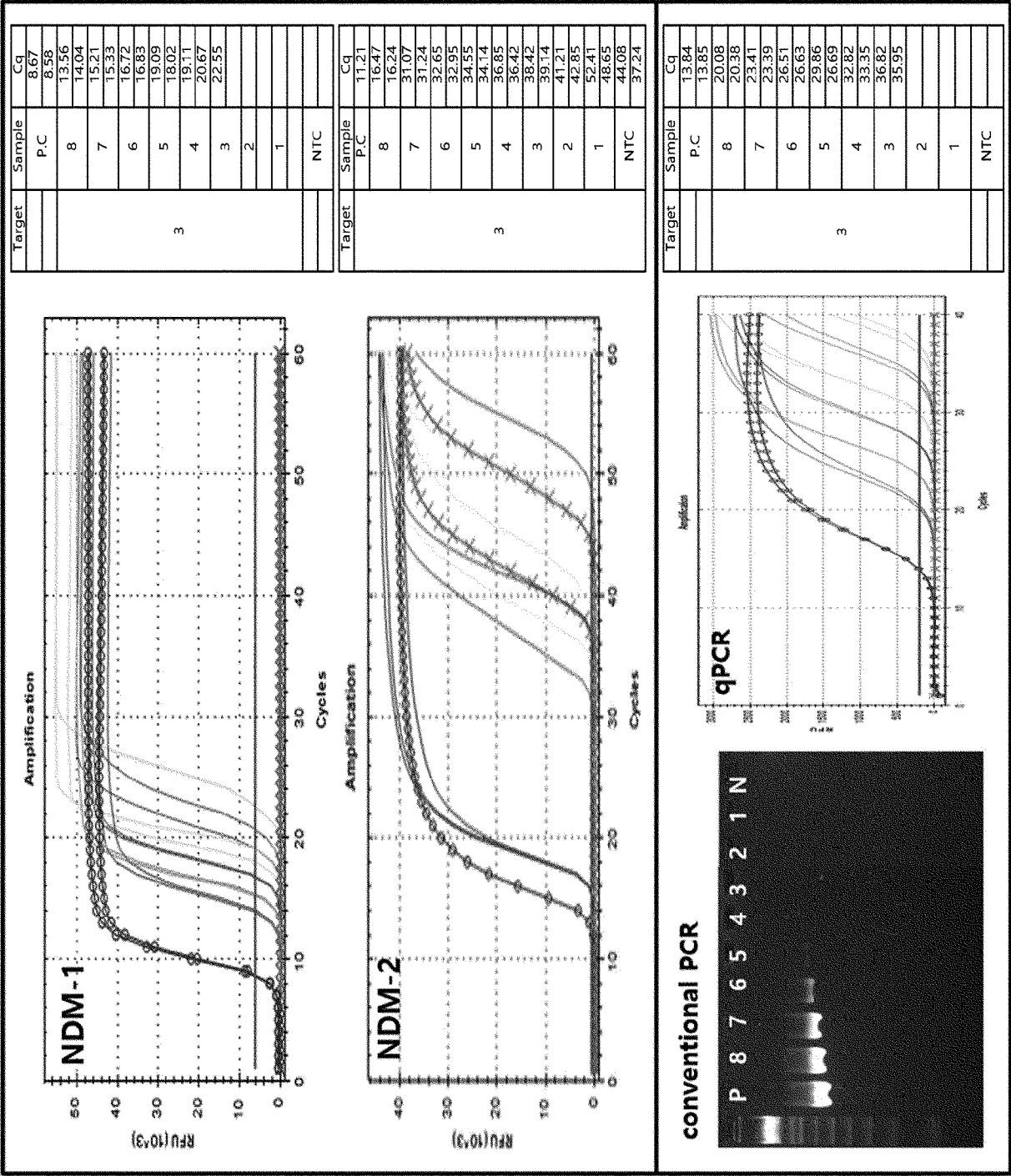
[도5a]



[도5b]



[도5c]



conventional PCR

P 8 7 6 5 4 3 2 1 N

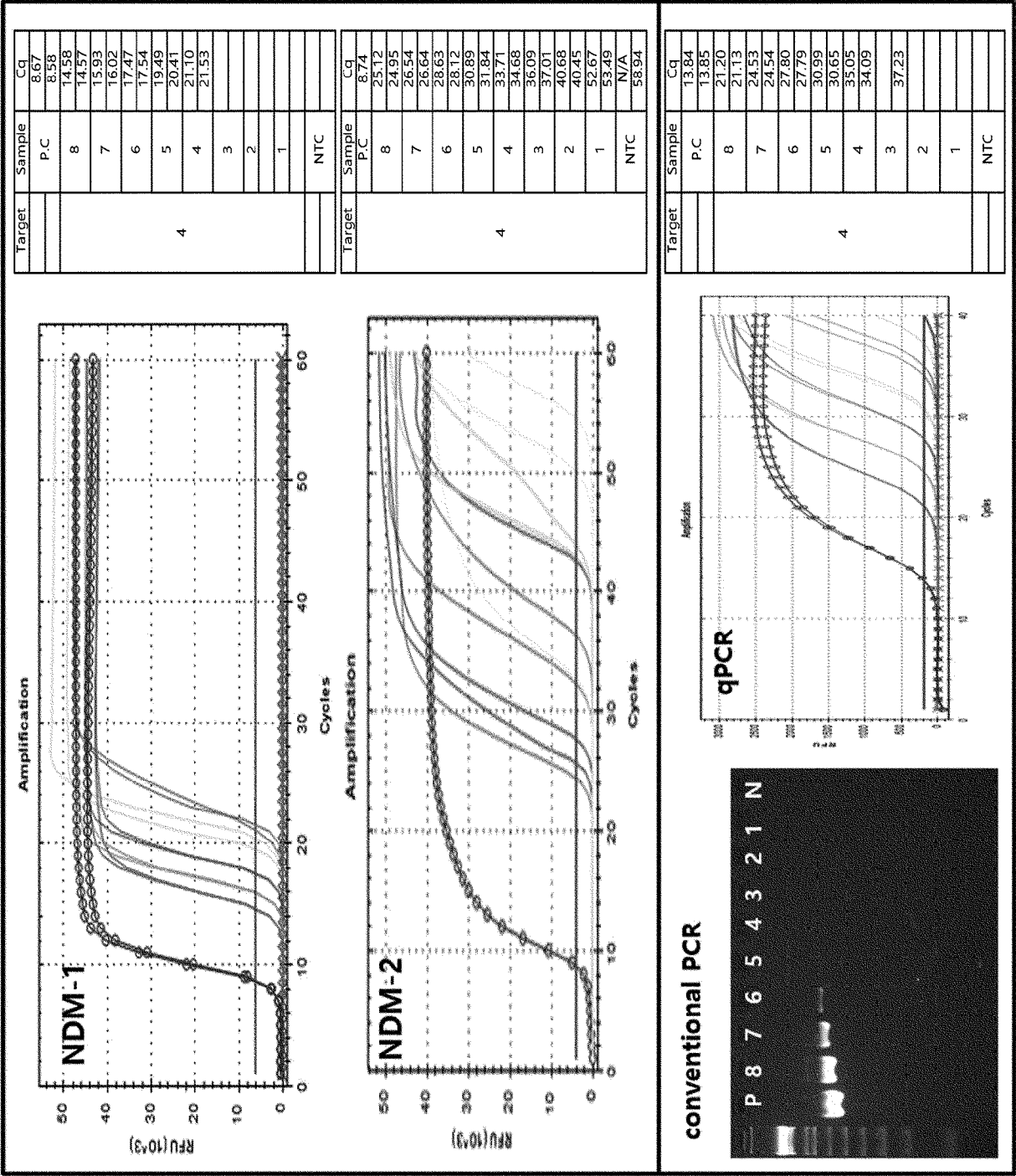
qPCR

Amplification

Cycles

Target	Sample	Cq
	P.C	13.84
		13.85
	8	20.08
		20.38
	7	23.41
		23.39
	6	26.51
		26.63
	5	29.86
		26.69
	4	32.82
		33.35
	3	36.82
		35.95
	2	
	1	
	NTC	

[도5d]



conventional PCR

P 8 7 6 5 4 3 2 1 N

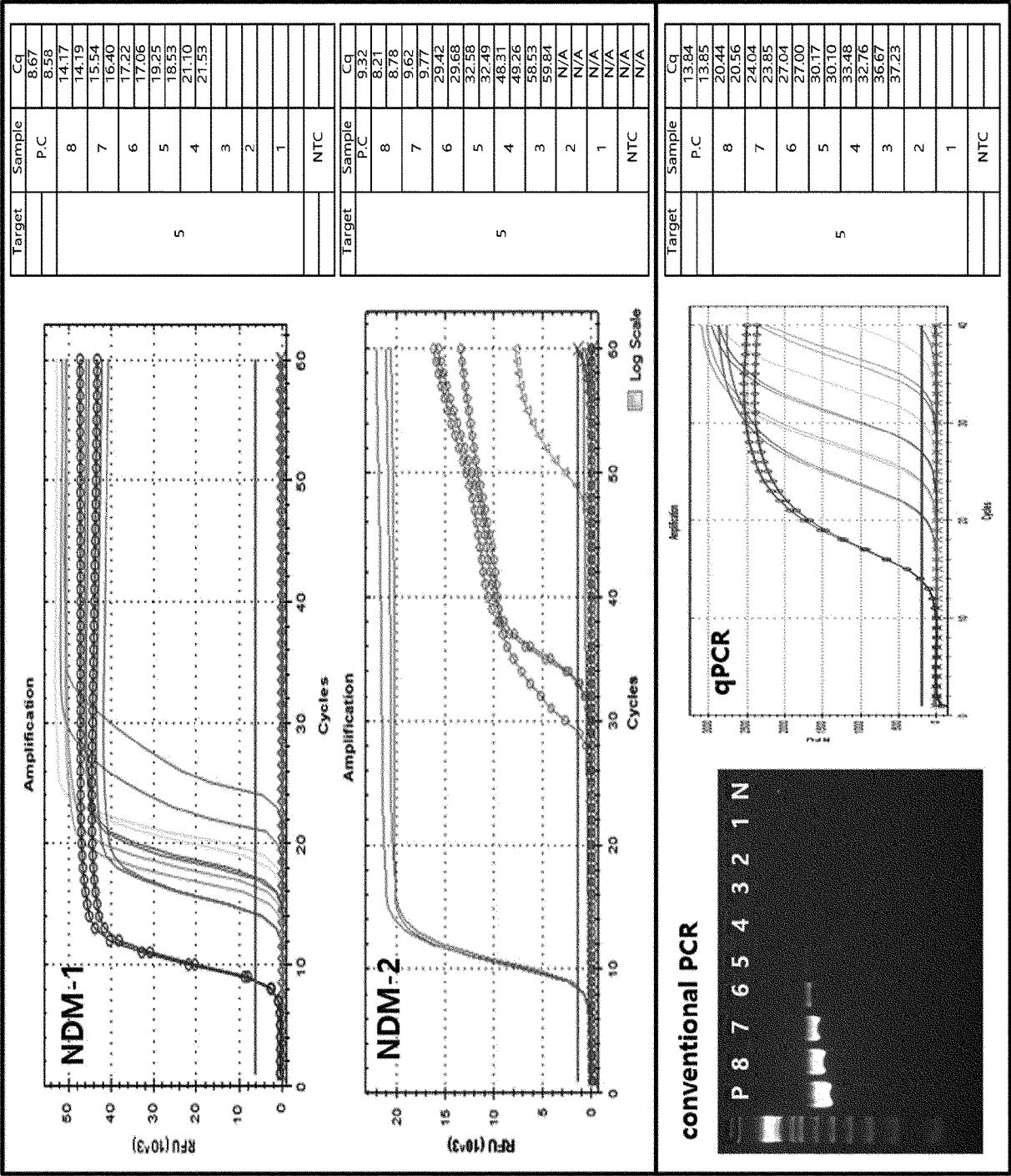
qPCR

RFU

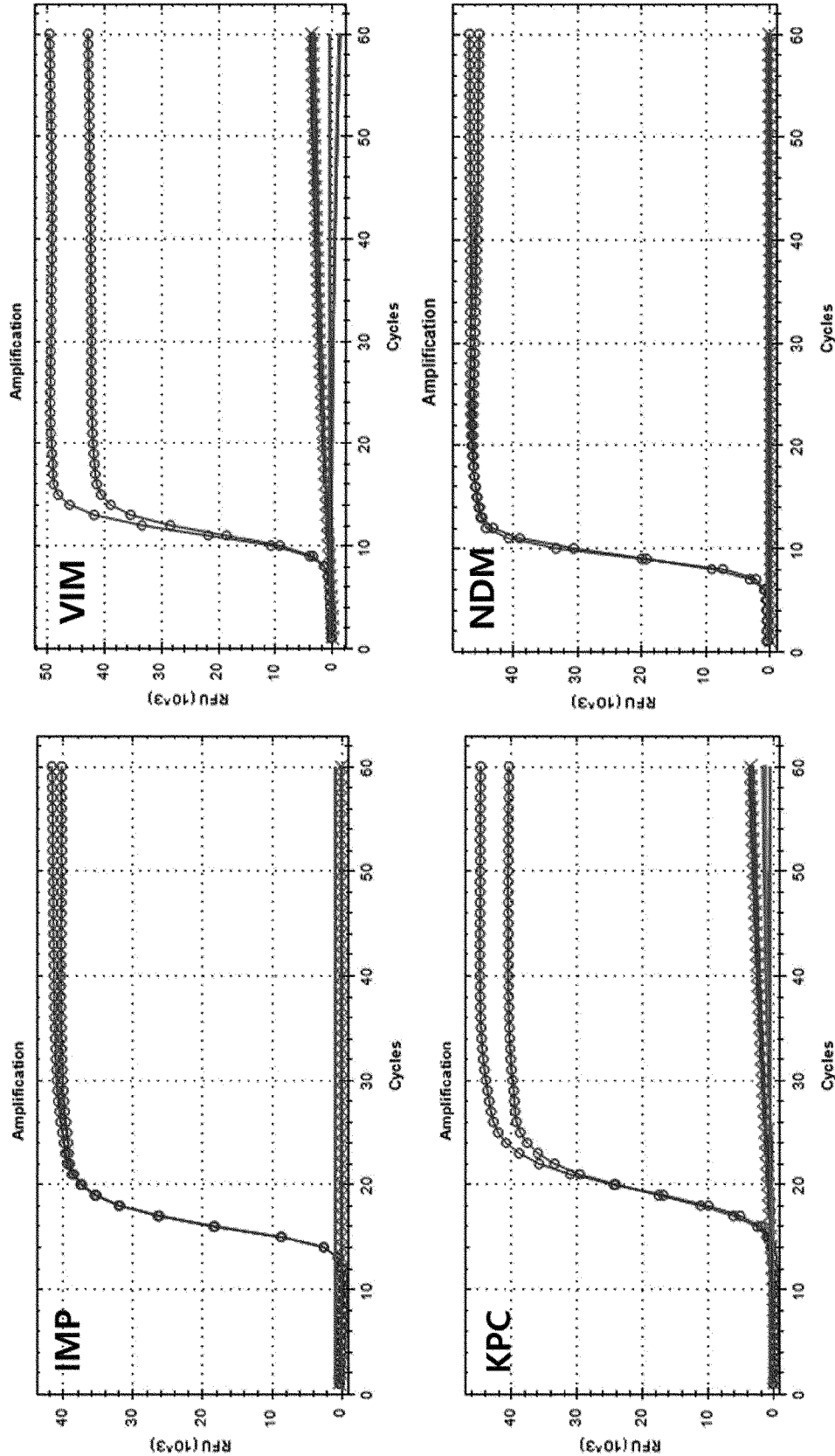
Cycles

Target	Sample	Cq
4	P.C	13.84
	8	13.85
	21.20	21.20
	21.13	21.13
	24.53	24.53
	24.54	24.54
	27.80	27.80
	27.79	27.79
	30.99	30.99
	30.65	30.65
35.05	35.05	
34.09	34.09	
3		
2		
1		
NTC		

[도5e]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013707

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/18(2006.01)i, C12Q 1/24(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/689; C12N 15/09; C12N 15/11; C12Q 1/68; C12Q 1/18; C12Q 1/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, IMP, VIM, KPC, NDM, LAMP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. J. CLIN. MICROBIOL. vol. 50, no. 12, pages 3877-3880, December 2012 See abstract; pages 3877-3880.	1-10
Y	CN 103614465 A (SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY et al.) 05 March 2014 See claim 7; paragraph [0080].	1-10
A	NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. NUCLEIC ACIDS RES. vol. 28, no. 12:E63, 15 June 2000 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2013-0005208 A (GENOCHECK CO., LTD.) 15 January 2013 See the entire document.	1-10
A	WO 2014-178401 A1 (TEIKYO UNIVERSITY) 06 November 2014 See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013707

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN103614465 A	05/03/2014	CN 103614465 B CN 201723805 U CN 202371402 U	26/08/2015 26/01/2011 08/08/2012
KR 10-2013-0005208 A	15/01/2013	KR 10-1317263 B1	10/10/2013
WO 2014-178401 A1	06/11/2014	JP 6358753 B2	18/07/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/689(2018.01)i, C12Q 1/18(2006.01)i, C12Q 1/24(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/689; C12N 15/09; C12N 15/11; C12Q 1/68; C12Q 1/18; C12Q 1/24

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 카바페넴아제 생성 장내세균(carbapenemase producing enterobacteriaceae), IMP, VIM, KPC, NDM, LAMP

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	DOYLE, D. 등, "Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases", J. CLIN. MICROBIOL., 50권, 12호, 페이지 3877-3880, 2012.12 초록; 페이지 3877-3880	1-10
Y	CN 103614465 A (SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY 등) 2014.03.05 청구항 7; 단락 [0080]	1-10
A	NOTOMI, T. 등, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", NUCLEIC ACIDS RES., 28권, 12호:E63, 2000.06.15 전	1-10
A	KR 10-2013-0005208 A ((주)지노텍) 2013.01.15 전문	1-10
A	WO 2014-178401 A1 (TEIKYO UNIVERSITY) 2014.11.06 전문	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 02월 05일 (05.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 05일 (05.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



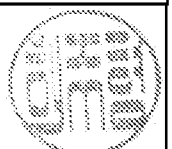
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN103614465 A	2014/03/05	CN 103614465 B CN 201723805 U CN 202371402 U	2015/08/26 2011/01/26 2012/08/08
KR 10-2013-0005208 A	2013/01/15	KR 10-1317263 B1	2013/10/10
WO 2014-178401 A1	2014/11/06	JP 6358753 B2	2018/07/18