(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 3 월 4 일 (04.03.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/040245 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/70 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/009829

(22) 국제출원일: 2020 년 7 월 24 일 (24.07.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0106466 2019 년 8 월 29 일 (29.08.2019) KR

(71) 출원인: 조선대학교산학협력단 **(INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 김동민 **(KIM, Dong Min)**; 61704 광주시 남구 봉선중앙로 6, 101동 402호, Gwangju (KR). 이유미 **(LEE, You Mi)**; 61736 광주시 남구 서문대로663번안길 2, 102동 1208호, Gwangju (KR). 김춘미 **(KIM, Choon Mee)**; 61414 광주시 동구 계림로30번길 15, 204동 1201호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 특허법인 남앤남 **(NAM & NAM)**; 04515 서울시 중구 서소문로 117, 3층, Seoul (KR).

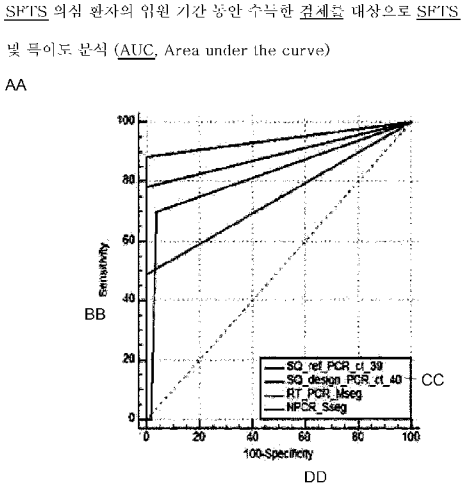
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

(54) **Title:** COMPOSITION FOR DETECTING SEVERE FEVER WITH THROMBOCYTOPENIA SYNDROME VIRUS GENE AND METHOD FOR DIAGNOSING SEVERE FEVER WITH THROMBOCYTOPENIA SYNDROME USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 중증열성혈소판감소증후군의 진단방법

(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for detecting a severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus gene and a method for diagnosing SFTS using same. Specifically, the present invention relates to a composition for detecting an SFTS virus gene comprising a primer pair of SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3 and a probe of SEQ ID NO: 4, a kit for diagnosing SFTS comprising the composition for detecting an SFTS virus gene, and a method for providing information for the diagnosis of an SFTS infection. The composition for detecting an SFTS virus gene according to the present invention and the method for diagnosing SFTS using same can specifically detect an S segment gene of the SFTS virus, and can detect all SFTS viruses of various clades in Korea, China, and Japan. Above all, since the method has superior accuracy and sensitivity compared to existing detection methods and enables detection of the SFTS virus in a short time, the method has the effect of being capable of rapidly and accurately diagnosing SFTS.



AA ... SFTS detection sensitivity and specificity analysis (AUC, area under the curve) for samples obtained during hospitalization of suspected SFTS patients
BB ... Sensitivity
CC ... SQ design_PCR_ct_40
DD ... 100-Specificity

WO 2021/040245 A1

[다음 쪽 계속]

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 중증열성혈소판감소증후군의 진단방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브; 를 포함하는 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물, 상기 SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물을 포함하는 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 진단용 키트 및 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 SFTS 진단방법은 SFTS 바이러스의 S 단편 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 한국, 중국, 일본의 다양한 계통군의 SFTS 바이러스를 모두 검출가능하며, 무엇보다 기존 알려진 검출 방법에 비해 정확도 및 민감도가 우수할 뿐만 아니라 빠른 시간 안에 SFTS 바이러스의 검출이 가능하므로, 중증열성혈소판감소증후군을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 중증열성혈소판감소증후군의 진단방법

기술분야

[1] 본 발명은 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 중증열성혈소판감소증후군의 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 중증열성혈소판감소증후군(Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)은 SFTS 바이러스에 의해서 발생하는 급성 발열성 질환으로 백혈구, 혈소판 수치 감소, 간기능 수치 상승, 단백뇨 등의 증상을 특징으로 한다. SFTS 바이러스에 감염된 진드기가 사람을 물어 조직액을 흡입함을 통해 감염이 이루어지며, 매개체로 Haemaphysalis longicornis (작은소참드기), Amblyomma testudinarium(뭉뚝 참진드기), Ixodes nipponensis (일본참진드기) 등이 있다.

[3] 전국적으로 SFTS 환자 발생이 증가추세에 있고, 사망률은 SFTS 인지도 증가에 따라 2013년 이후 2016년까지 47.6%, 29.1%, 26.6%, 11.5%로 감소하는 추세였으나 2017년 사망 환자수가 급격히 증가하여 22.3%로 전년대비 10.8% 증가하였다. 따라서 지구 온난화로 인한 진드기 개체수 증가로 SFTS 환자는 계속 증가할 것으로 예상되므로 SFTS 감염에 대한 신속하고 정확한 진단이 환자의 예후 개선을 위해 필수적이다.

[4] 현재, 중증열성혈소판감소증후군의 진단은 환자의 혈액을 이용하여 바이러스를 분리하는 방법, 환자의 혈청을 이용하여 IFA나 ELISA 분석을 통해 항체가의 상승을 확인하는 방법, 환자의 혈청이나 혈장을 이용하여 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real time RT-PCR)이나 nested RT-PCR로 환자의 혈액내의 SFTS 바이러스 RNA를 증폭하여 검사하는 방법이 있다.

[5] 이 중에서 바이러스를 배양하여 진단하는 방법은 BSL3 시설이 필요하며, 배양되는데 시간이 다소 걸릴 수 있어 일반병원에서 시행하기 어려우므로, 주로 진단에 사용되는 검사 방법들은 혈청학적 검사인 간접면역형광항체법, 면역효소법이 가장 흔히 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법들 또한 다른 병원체와 교차반응으로 위양성 반응이 있고, 증상 발생 후 항체 형성까지 수일이 소요되어 질병의 조기에 내원하여 검사를 시행할 경우 민감도가 낮으며, 확진을 위해서는 추적 검사가 필요하다는 단점이 있다.

[6] 특히, SFTS 바이러스를 질병 초기에 신속하게 진단하기 위해 환자의 혈액에서 바이러스의 특이 유전자를 검출하는 PCR 법에는 전통적인 방법에 의해 이루어지는 conventional RT-PCR과, 이를 변형하여 conventional RT-PCR 보다 100배 더 민감한 nested RT-PCR 방법이 있고, 또한 PCR이 진행되는 중에 결과를 실시간으로 확인할 수 있는 실시간(real time) RT-PCR 방법 등이 있다.

중증열성혈소판감소증후군 바이러스는 단일가닥 RNA 바이러스로 Bunyaviridae과, phlebovirus 속에 속하며, 바이러스 유전체는 Large(L), Medium(M), Small(S) 단편(segment)으로 구성되어 있다. SFTS 바이러스를 검출하기 위한 RT-PCR 진단방법으로 이들 3개의 단편(L, M, S segment)을 타겟으로 실시간 RT-PCR 및 nested RT-PCR법이 주로 이용되고 있으나, nested RT-PCR의 경우 PCR을 2번 시행하여 민감도가 상승하지만, 2회의 PCR 수행에 의해 필요 이상의 인력 및 시간이 소요되고, 잠재적인 오염가능성이 더 높아 단 한번으로도 민감도가 우수한 새로운 진단법의 개발이 매우 절실한 실정이다.

[7] 한편, SFTS 바이러스의 3개의 단편은 RNA-dependent RNA polymerase, RdRp를 암호화하는 L 단편, 바이러스 막 단백질의 구성성분인 glycoprotein(Gn과 Gc)을 암호화하는 M 단편, 바이러스 핵단백질로 SFTS 바이러스 유래 단백질 중 발현양이 많으며 감염숙주로 하여금 세포성 면역반응을 유발하는 nucleocapsid protein(NP)과 면역회피 기능을 하는 nonstructural protein (NSs)를 암호화하는 S 단편으로 구성되어있다. SFTS는 한국, 중국, 일본이 주로 유행지역으로 SFTS 바이러스의 M 단편과 S 단편의 염기서열을 토대로 계통분석 시 각 나라별 발생하는 바이러스의 유전자 서열이 서로 달라 Japanese(J) clade, Chinese(C) clade, 및 Korean(K) clade로 분류가능하다.

[8] 이에 SFTS 감염에 대한 신속하고 정확한 진단 및 치료를 위해 Japanese(J) clade, Chinese(C) clade 및 Korean(K) clade의 SFTS 바이러스 유전자를 질병초기에 신속하게 모두 진단할 수 있는 민감도와 특이도가 우수한 진단방법의 개발이 무엇보다 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 따라서, 본 발명에서는 이러한 점을 감안하여, SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물을 제공하고, 이를 통해 SFTS 바이러스의 확인 및 중증열성혈소판감소증후군의 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물을 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍; 및 서열번호 4의 프로브;를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브;는 서열번호 1(SFTSV S 단편의 염기서열)로 이루어진

중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome) 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.

[14] 또한 본 발명은 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물을 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 진단용 키트를 제공한다.

[15] 또한 본 발명은, (1) 중증열성혈소판감소증후군의 감염이 의심되는 환자에서 분리된 시료에서 바이러스성 RNA를 분리하는 단계; (2) 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 합성한 cDNA를 주형으로 하고, 제3항의 키트를 사용하여 실시간 RT-PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 단계(3)을 통해 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계 (1)의 시료는 포유동물로부터 수득한 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변; 또는 참진드기;일 수 있다.

[17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계 (2)에서 상기 RNA로부터 cDNA 합성은 SFTS 바이러스의 RNA 유전체로부터 역전사효소 (reverse transcriptase)의 작용을 통한 역전사(reverse transcription) 반응을 별도로 수행하여 상보적 DNA(cDNA)를 합성하는 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계 (4)에서 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자의 확인은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 방법으로 수행하는 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계 (4)에서 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 유전자는 서열번호 1로 이루어진 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)일 수 있다.

발명의 효과

[20] 본 발명에 따른 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물 및 이를 이용한 SFTS 진단방법은 SFTS 바이러스의 S 단편 유전자를 특이적으로 검출할 수 있으며, 기존 알려진 검출 방법에 비해 정확도 및 민감도가 우수할 뿐만 아니라 빠른 시간 안에 SFTS 바이러스의 검출이 가능하므로, 중증열성혈소판감소증후군을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 본 발명에서 고안한 SFTS 바이러스 유전자 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 바이러스 검출한계를 확인하기 위해 실시간 RT-PCR 수행 후, LOD 값을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 본 발명의 일실시예에서 SFTS 의심 환자의 입원 당일 수득한 검체를

대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 검출 민감도 및 특이도 분석 결과를 나타낸 것이다.

[23] 도 3은 본 발명의 일실시예에서 SFTS 의심 환자의 입원 기간 동안 환자로부터 수득한 검체를 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 검출 민감도 및 특이도 분석 결과를 나타낸 것이다.

[24] 도 4는 본 발명의 일실시예에서 본 발명의 방법에 따른 SFTS 검출 특이도 분석을 위해 음성대조군으로 사용한 세균과 바이러스들을 기재한 목록이다.

[25] 도 5는 본 발명의 일실시예에서 분석한 각 환자 시료의 SFTS 바이러스의 M 단편 염기서열을 토대로 제작한 SFTSV의 계통수로서 SFTS 바이러스가 바이러스 유전자 염기서열에 따라 Korea clade(K1~K4), Japan clade(J1~J3) 및 China clade(C1~C4)로 분류되는 것을 확인할 수 있다.

[26] 도 6은 진드기를 이용한 실험으로 6A는 참진드기 시료를 대상으로 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하여 실시간 RT-PCR 분석을 통해 SFTSV 검출 가능함을 확인한 결과이고, 6B는 RT-PCR 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27] 본 발명은 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스 유전자를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 새로운 검출용 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[28] 본 발명자들은 SFTS 감염에 대한 정확하고 신속한 진단 및 치료를 위해, SFTS 바이러스 특이 유전자를 검출할 수 있는 방법을 연구하던 중, 동정된 SFTS 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)에 특이적으로 결합하여 SFTS 바이러스를 높은 민감도와 정확도로 검출할 수 있는 프라이머 및 프로브를 발굴하였다.

[29] 한편 앞서 종래기술에서도 기술한 바와 같이,
중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스는 단일가닥 RNA 바이러스로 Bunyaviridae과, phlebovirus 속에 속하며, 바이러스 유전체는 3개의 단편(segment)으로 구성되어 있다. SFTS 바이러스의 3개의 단편은 RNA-dependent RNA polymerase, RdRp를 암호화하는 L 단편(Large segment, L segment), 바이러스 막 단백질의 구성성분인 glycoprotein(Gn과 Gc)을 암호화하는 M 단편(Medium segment, M segment), 바이러스 핵단백질로 SFTS 바이러스 유래 단백질 중 발현양이 많으며 감염숙주로 하여금 세포성 면역반응을 유발하는 nucleocapsid protein (NP)과 면역회피 기능을 하는 nonstructural S protein (NSs)를 암호화하는 S 단편(Small segment, S segment)으로 구성되어있다. 보고에 따르면 Bunyaviruses의 S 단편 내에서 nonstructural S protein(NSs)은 바이러스가 인간의 선천적인 항바이러스 방어에 대항하도록 하므로 NS 단백질은 바이러스 감염에 있어 주요한 독력 결정인자중의 하나로 잘 알려져 있다.

[30] 본 발명에서는 한국의 환자 및 매개체에서 분리된 SFTS 바이러스 유전자의 3개의 단편 중, S 단편(Small segment, S segment) 내에서 nonstructural S protein(NSs)유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 및 프로브를 발굴하기 위한 실험을 수행하였고, 각기 다른 염기서열로 구성된 많은 프라이머 및 프로브들 중에서 SFTS 바이러스 유전자에 대해 민감도 및 특이도가 월등히 우수한 프라이머 및 프로브를 발굴하였으며, 발굴된 프라이머를 SFTS-S 583F 프라이머(5-AGAGGMATGAGCTTGAAC-3; 서열번호 2) 및 SFTS-S 653R 프라이머(5-TCCCAACAGTCTAAYAGA-3; 서열번호 3) 명명하였고, 상기 프로브는 SFTS-S 602P 프로브(5-ACCACTTATTCACTTCTTCCTCATTGC-3; 서열번호 4)로 명명하였다.

[31] 여기서 상기 M은 A 또는 C 염기일 수 있고, 상기 Y는 C 또는 T 염기일 수 있다.

[32] 따라서, 본 발명은 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프로브;를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물을 제공함에 특징이 있다.

[33] 또한 본 발명에서 상기 프라이머 및 프로브는 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome) 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)의 nonstructural S protein(NSs)유전자에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 S 단편은 서열번호 1로 이루어진 염기서열을 갖는다.

[34] 또한 본 발명의 실시예 1에서는, SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단을 위해 새로운 프라이머와 프로브를 디자인하였다. 실시예 2에서는 실시예 1에서 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단을 위한 디자인한 프라이머와 프로브들을 이용하여 실시간 RT-PCR을 수행하여 최적의 프라이머와 프로브를 선별하였다. 본 발명에서 발굴한 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍 및 서열번호 4의 프로브를 이용하여 실시간 RT-PCR을 수행하여 SFTS 바이러스의 검출능을 분석한 결과, 다른 염기서열로 구성된 프라이머 및 프로브들에 비해 본 발명의 프라이머 및 프로브를 사용한 경우, 민감도 및 특이도가 가장 우수한 것으로 나타났고, 나아가 종래 사용되는 SFTS 바이러스 검출법에 비해서도 더 우수한 민감도 및 특이도를 보임에 따라, 본 발명이 종래 방법에 비해 SFTS 바이러스 유전자를 더 높은 정확도와 민감도로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[35] 본 발명의 실시예 2에서는, 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍 및 서열번호 4의 프로브를 이용한 실시간 RT-PCR을 통해, 71 bp의 크기를 갖는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 SFTS 바이러스의 S 단편의 증폭산물을 확인할 수 있었으며, 구체적으로 상기 71 bp의 염기서열은 agaggaatgagcttgaaccaccacttattcacttcttcctcattgcgtaagcctctattagactgttggga(서열번호 5)이다.

[36] 또한 본 발명에 따른 상기 SFTS 바이러스 유전자 검출용 조성물은 SFTS

바이러스의 S 단편을 특이적으로 높은 민감도 및 정확도로 검출할 수 있는 본 발명의 프라이머 및 프로브를 포함하는 조성물로서, 분석하고자 하는 시료에 SFTS 바이러스의 존재 여부에 대한 분석뿐만 아니라 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS)의 진단을 위한 진단용 조성물로도 사용될 수 있다.

[37] 그러므로 본 발명은 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브;를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[38] 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.

[39] 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.

[40] 또한 상기 조성물은 실험상의 편의, 안정화 및 반응성 향상을 위해 안정화제 및/또는 비반응성 염료 등을 포함할 수 있다.

[41] 상기 비반응성 염료 물질이란 중합효소 연쇄반응에 영향을 미치지 않는 물질로부터 선택되어져야 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.

[42] 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.

[43] 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 방지 할 수 있으며, 안정성, 반응성 및 보관성을 향상 시킬 수 있다.

[44] 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.

[45] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 조성물을 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[46] 본 발명에 따른 상기 진단용 키트에는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브;를 포함하고 있어 중증열성혈소판감소증후군(SFTS)을

매우 높은 정확도로 진단할 수 있다.

[47] 상기 진단은 분석하고자 하는 검체 시료에 SFTS 바이러스가 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.

[48] 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.

[49] 또한 본 발명의 진단 키트는 상기 키트의 사용 방법을 지시하는 설명서를 포함할 수 있다.

[50] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 진단 키트는 일반적인 중합효소연쇄반응 또는 실시간 중합효소연쇄반응 등에 사용될 수 있는데, 이 경우 SFTS 바이러스의 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.

[51] 중합효소연쇄반응의 결과물은 아가로즈 겔 전기영동 (agarose gel electrophoresis) 또는 모세관 전기영동(capillary electrophoresis) 등의 방법으로 분리할 수 있으며, 사용된 프라이머쌍에 의해 중합된 DNA에 해당하는 길이를 갖는 DNA의 존재를 확인하여 중증열성혈소판감소증후군을 진단할 수 있다.

[52] 또한 본 발명에서는 SFTS 바이러스 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 서열번호 4의 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 5말단 에는 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.

[53] 나아가 본 발명은 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단방법을 제공할 수 있으며, SFTS 감염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[54] 바람직하게 상기 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법은, (1) 중증열성혈소판감소증후군의 감염이 의심되는 환자에서

분리된 시료에서 바이러스성 RNA를 분리하는 단계; (2) 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (3)상기 단계 (2)에서 합성한 cDNA를 주형으로, 실시예 3에서 사용된 키트를 사용하여 실시간 RT-PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (4) 상기 단계 (3)를 통해 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 유전자를 확인하는 단계;를 포함한다.

[55] 상기 시료는 이에 제한되지는 않으나, 포유동물로부터 수득한 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변; 또는 참진드기;일 수 있다.

[56] 또한 상기 방법에서 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 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.

[57] 또한 본 발명의 방법에 있어서, 상기 SFTS는 SFTS 바이러스에 의해 감염되어 유발되는 질병을 지칭한다.

[58] 이상 본 발명에서 고안한 SFTS 바이러스의 S 단편에 특이적으로 결합하는 서열번호 2 및 3의 프라이머쌍 및 서열번호 4의 프로브를 이용할 경우, SFTS 바이러스를 높은 민감도와 정확도로 신속하게 검출이 가능한 장점이 있으며, 하기 본 발명의 실시예를 통해 실제 SFTS로 의심되는 환자들의 시료를 대상으로 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 실시간 RT-PCR 분석법을 수행한 결과, 내원 당시 환자의 시료를 대상으로 한 분석에서 97%의 높은 민감도와 100%의 특이도로 신속한 진단이 가능함을 확인하였을 뿐만 아니라 SFTS 환자가 병원 내원이 지연된 경우의 민감도를 예측할수 있는 SFTS의 의심환자의 입원 전체 기간 동안 채혈 검체를 대상으로 한 분석에서도 88%의 높은 민감도와 100%의 특이도로 정확도가 우수한 진단이 가능하다는 것으로 확인하였다.

[59] 또한, 본 발명의 방법에 따른 상기와 같은 진단 정확도는 종래 사용되었던 진단 방법을 수행한 경우와 다른 종류의 프라이머와 프로브를 이용한 경우에 비해 월등히 우수한 것으로 나타났다.

[60] 그러므로 본 발명에서 고안한 SFTS 검출용 조성물을 이용한 SFTS 감염 진단 방법 및 감염 진단을 위한 정보 제공방법은 SFTS를 조기에 신속하고 정확하게 진단할 수 있으며, 실시간으로 SFTS 바이러스의 검출이 가능하기에 발병 후, 시간이 상당히 경과된 시점에서도 높은 정확도로 진단할 수 있고, 타질환과 SFTS의 질병을 높은 특이도로 구별할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[61] 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.

[62]

[63] <실시예 1>

[64] SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단을 위한 프라이머 및 프로브 제작

[65] 본 발명자들은 SFTS 바이러스의 S 단편 서열을 대상으로, 중증열성혈소판감소증후군을 신속하고 정확하며 높은 민감도로 검출할 수 있는 새로운 진단용 프라이머 및 프로브를 하기 표 2와 같이 디자인 하였다.

[66] 또한 하기 표 2의 프라이머 및 프로브 디자인을 위해 하기 표 1에 기재된 SFTS 바이러스의 S 단편 서열을 참고하였다.

[67] [표1]
한국, 중국 및 일본의 환자에서 동정된 SFTS 바이러스의 S 단편(segment)에 대한 정보

GenBank accession NO. of S segment	Strain/isolate	Isolation source	Country
AB817995	YG1	Human	Japan
AB817996	SPL003A	Human	Japan
AB817999	SPL010A	Human	Japan
AB818002	SPL035A	Human	Japan
AB985526	SPL057A	Human	Japan
AB985529	SPL066A	Human	Japan
AB985532	SPL070A	Human	Japan
AB985541	SPL087A	Human	Japan
AB985544	SPL097A	Human	Japan
AB985545	SPL100A	Human	Japan
AB985551	SPL112A	Human	Japan
AB985554	SPL120A	Human	Japan
AB985557	SPL125A	Human	Japan
AB985559	SPL129A	Human	Japan
HM745932	HB29	Human	China
HM802204	SD4	Human	China
HM802205	SD24	Human	China
HQ141591	AH12=AH12/China/2010	Human	China
HQ141606	JS4	Human	China
HQ171192	HGX	Human	China
HQ171193	HZM	Human	China
HQ171194	WWG	Human	China
HQ419239	2010-WSQ	NA	China
HQ830168	JS26	Human	China
JQ670932	AHL/China/2011	Human	China
JQ693002	SDLZSheep01/2011	Sheep	China

JQ733562	HB154/China/2011	Human	China
JQ733565	HB155/China/2011	Human	China
JQ733568	HB156/China/2011	Human	China
KC505137	JS2011-062	Human	China
KF358693	Gangwon/Korea/2012	Human	Korea
KF374683	Zhao	Human	China
KF711897	2011YPQ11	Human	China
KF791948	HL/Injected	Human	China
KF887435	LN2012-58	Human	China
KJ597823	Zhejiang/01/2011	Human	China
KP202165	HB29	Vero cells	China
KP663733	KASJH	Human	Korea
KP663736	KAGWH3	Human	Korea
KP663739	KAGBH5	Human	Korea
KP663742	KAGBH6	Human	Korea
KP663745	KACNH3	Human	Korea
KR017811	AH-YTY/China/05/2012	Human	China
KR017821	ZJZHSH-FDE/China/06/2012	Human	China
KR017825	ZJZHSH-LWL/China/08/2014	Human	China
KR017826	ZJZHSH-WRF/China/08/2014	Human	China
KR612072	AP01	Human	Korea
KR612073	CP01	Human	Korea
KR612076	JP01	Human	Korea
KR706565	QD7	Human	China
KU507553	KADGH	Human	Korea
KU507555	KAGNH	Human	Korea
KU507556	KAGNH4	Human	Korea
KU507557	KAJNH2	Human	Korea

KU507577	KAUSH2	Human	Korea
KY789439	CB1	Human	Korea
KY789440	CB2	Human	Korea
KY789441	CB3	Human	Korea
NC_018137	HB29	Human	China

[68] [표2]

SFTS 바이러스 유전자 검출을 위해 디자인한 프라이머 및 프로브

No.	Primers/probes Name	Sequences(5'-> 3')	Length	Product Length(bp)
1	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACTTCTTCCTC ATTGC	27	
2	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACTTCTTCCTC ATTGC	27	
3	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 603P	CCACTTATTCACTTCTTCCTCAT TGCG	27	
4	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 598P	AACCACCACTTATTCACTTCTT CCTCA	27	
5	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 599P	ACCACCACTTATTCACTTCTTC CTCA	26	
6	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 604P	CACTTATTCACTTCTTCCTCATT GCGT	27	
7	SFTS-S 576F	AAGGCTAAGAGGMATGAG	18	78
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 602P	ACCACTTATTCACTTCTTCCTC ATTGC	27	

8	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 603P	CCACTTATTCACTTCTTCCTCATTGCG	27	
9	SFTS-S 583F	AGAGGMATGAGCTTGAAC	18	71
	SFTS-S 653R	TCCCAACAGTCTAAYAGA	18	
	SFTS-S 604P	CACTTATTCACTTCTTCCTCATTGCGT	27	

[69] 상기 표에서 M은 A 또는 C 염기일 수 있고, 상기 Y는 C 또는 T 염기일 수 있다.

[70]

[71] <실시예 2>

[72] SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단을 위한 최적의 프라이머와 프로브 선별

[73] 상기 실시예 1에서 디자인한 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단을 위한 프라이머와 프로브를 대상으로 실시간 RT-PCR을 수행하여, 민감도 및 특이도 검사를 수행하였다.

[74] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 플라스미드 DNA(SFTS 바이러스의 S segment가 클로닝된 재조합 벡터 DNA)를 이용하여 검출한계(Limit of Detection, LOD)를 확인하였을 때, 상기 표 2의 프라이머 및 프로브들 중에서, 1번째(No.1)의 프라미어 및 프로브를 사용한 경우, 다른 프라이머 및 프로브를 사용한 군에 비해서 더 우수한 민감도 및 특이도를 나타내었고, 또한 기존의 SFTS 바이러스 검출을 위한 검사법에 비해서도 더 우수한 민감도 및 특이도를 나타내었다. 구체적으로 1번째(No.1)의 프라미어 및 프로브를 사용한 경우, 실시간 RT-PCR 분석 결과, 95% 검출($LOD_{95\%}$)이 39.739 copy/test(ct 40.3)로 확인되었으며, 기존의 SFTS 바이러스 검출용 검사법 수행 시에는, 96.332 copy/test(ct 38.9)로 나타나, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 사용한 경우, 실시간 RT-PCR의 민감도가 더 높아 SFTS 바이러스 유전자의 검출 및 진단을 위해 시간과 비용을 모두 절약할 수 있으며, 검출 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[75]

[76] <실시예 3>

[77] 환자로부터 수득한 시료를 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브를 이용한 SFTS 검출능 분석

[78] 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브(상기 표 1의 No.1 번의 프라이머(SFTS-S 583F, 653R 프라이머) 및 프로브(SFTS-S 602P 프로브))가 실제로 SFTS 감염을 진단하는데 사용 가능한지 확인하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[79] 이를 위해 실험에 사용한 시료는 하기 3가지를 만족하는 환자로부터 수득한 시료를 대상으로 분석하였다.

[80] ① 만19세 이상인 자

[81] ② SFTS 감염으로 고려되는 자

[82] 증상 발생 후부터 연구 참여 평가시점까지 SFTS 증상이 객관적으로 확인된 자로서, 하기에 해당되는 자

[83] - 발열 (액와체온 >37.8 ℃)

[84] - 혈소판 감소증 (platelet < 100 X 109/L)

[85] - 백혈구 감소증 (WBC < 5 X 109/L)

[86] ③ 감염내과 의사에 의해 SFTS가 의심되는 경우

[87]

[88] 위의 3가지를 만족하는 환자를 대상으로 SFTS RT-PCR 검사를 시행하였으며 SFTS 의 확진은 IFA 4배 이상 상승하거나 바이러스 분리로 정의하여 각각의 PCR법을 수행하여 정확도를 평가하였다.

[89] 또한, 민감도 확인 검체는 2018년도 SFTS 환자 대상으로 진행되었고, 환자 36명으로부터 119개의 혈액검체를 수집하여 사용하였으며, 특이도 확인을 위한 검체는 2008년부터 2018년 사이에 수집된 검체로 SFTS가 아닌 타질환으로 확진된 환자 50명을 대상으로 진행하였다. 참고로, 특이도 검사를 위해 음성대조군으로 사용한 병원체들과 바이러스들의 목록은 도 4에 나타내었다.

[90] 민감도 및 특이도 비교를 위하여 다른 PCR을 시행하였는데, 환자의 plasma, WB(whole blood)로부터 바이러스 RNA를 추출하였고, 상기 추출은 바이러스 Gene-spinTM 바이러스 DNA/RNA 추출키트(intron)를 이용하여 수행하였다. 이후 상기 RNA로부터 SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen)을 사용하여 cDNA를 합성하여 주형 DNA로 사용하였으며, 실시간 RT-PCR 다음과 같이 진행되었다.

[91] SFTS 바이러스의 S 단편을 타겟으로 하는 실시간 RT-PCR은 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용한 방법과 하기 표 3의 종래 개시된 방법의 PCR로 각각 진행하였으며, S 단편을 타겟으로 하는 nested RT-PCR 및 M 단편을 타겟으로 하는 RT-PCR을 수행하였다. 실시간 RT-PCR은 LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics, Indianapolis)를 사용하였으며, 96 Excycler (Bioneer)기기로 PCR을 수행하였다. RT-PCR과 nested RT-PCR은 Accupower PCR premix(Bioneer)와 cDNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 수행된 각각의 PCR의 정보는 하기 표 4에 나타낸 바와 같다.

[92] [표3]
PCR에 사용한 프라이머, 프로브 정보

PCR	Gene	Primer name	Sequences
실시간 RT-PCR(reference)	S-seg	SFTS-SQ-F	5‘-ACCTCTTTGACCCTGAGTTWGACA-3‘
		SFTS-SQ-R	5‘-CTGAAGGAGACAGGTGGAGATGA-3‘
		SFTS-SQ-P	5‘-TGCCTTGACGATCTTA-3‘
실시간 RT-PCR(본발명)	S-seg	SFTS-S 583F	5‘-AGAGGMATGAGCTTGAAC-3’
		SFTS-S 653R	5‘-TCCCAACAGTCTAAYAGA-3’
		SFTS-S 602P	5‘-ACCACTTATTCACTTCTTCCTCATTGC-3’
RT-PCR	M-seg	SFTS-F(=MF3)	5′-GATGAGATGGTCCATGCTGATTCT-3′
		SFTS-R(=MR2)	5′-CTCATGGGGTGGAATGTCCTCAC-3′
Nested RT-PCR	S-seg	SFTS-S-NP-2F	5′-CATCATTGTCTTTGCCCTGA-3′
		SFTS-S-NP-2R	5′-AGAAGACAGAGTTCACAGCA-3′
		SFTS-S-N2F	5′-AAYAAGATCGTCAAGGCATCA-3′
		SFTS-S-N2R	5′-TAGTCTTGGTGAAGGCATCTT-3′

[93] [표4]
PCR 수행 조건

			실험조건(1차)		실험조건(2차)	
PCR	단계	기능	온도	시간(hh:mm:ss)	온도	시간(hh:mm:ss)
실시간 RT-PCR(S-segment,reference)	1	INCUBATE	95	00:05:00		
	2	INCUBATE	95	00:00:05		
	3	INCUBATE	55	00:00:05		
	4	Scan	FAM			
	5	GOTO	Step2	45 cycle		
	6	INCUBATE	25	00:01:00		
실시간 RT-PCR(S-segment,design)(본 발명)	1	INCUBATE	95	00:05:00		
	2	INCUBATE	95	00:00:05		
	3	INCUBATE	51	00:00:05		
	4	Scan	CY5			
	5	GOTO	Step2	45 cycle		
	6	INCUBATE	25	00:01:00		

RT-PCR(M-segment)	1	INCUBATE	95	00:10:00		
	2	INCUBATE	95	00:00:20		
	3	INCUBATE	58	00:00:40		
	4	INCUBATE	72	00:00:30		
	5	GOTO	Step2	35 cycle		
	6	INCUBATE	72	00:02:00		
Nested RT-PCR(S-segment)	1	INCUBATE	95	00:10:00	94	00:10:00
	2	INCUBATE	94	00:00:20	94	00:00:20
	3	INCUBATE	53	00:00:20	57	00:00:20
	4	INCUBATE	72	00:00:30	72	00:00:30
	5	GOTO	Step2	35 cycle	Step2	30 cycle
	6	INCUBATE	72	00:02:00	72	00:02:00

[94] [표5]
민감도 및 특이도 결과

PCR 수행조건	민감도(Sensitivity)		특이도(specificity)	소요시간
	입원당시 및 추적검체 포함(n=119)	입원당시 검체(n=36)	n=50	
실시간 RT-PCR(S-segment, reference)cutoff=39	70.6%	88.9%	98%	1-2h
실시간 RT-PCR(S-segment, design)cutoff=40 (본 발명)	88.2%	97.2%	100%	1-2h
RT-PCR(M-segment)	48.7%	61.1%	100%	2-3h
Nested RT-PCR (S-segment)	78.2%	91.7%	100%	4-5h

[95] 분석결과, 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 다른 PCR 방법에 비해 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용하여 수행한 실시간 RT-PCR 분석 결과가 민감도 및 특이도 분석에서 가장 우수한 값으로 나타나, 검출 효과가 가장 우수함을 알 수 있었으며, 기존 다른 방법에 비해 1~2시간의 짧은 시간 만에 SFTS 바이러스를 정확하게 진단 및 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

[96]

[97] <실시예 4>

[98] 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브를 이용한 SFTS 검출 정확도 검증

[99]

[100] <4-1> 내원 당시 검체를 이용한 PCR 진단법의 정확도

[101] 내원 당시의 환자 검체(혈액)를 대상으로 본 발명에서 고안한 SFTS 바이러스 유전자 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 PCR 분석법으로 SFTS 검출에 대한 민감도 및 특이도 검증 분석을 수행하였다.

[102] [표6]
내원 당시 검체를 이용한 PCR 진단법의 정확도

1st	SFTS positive = 36 / Negative = 50 환자 대상							
	SQ ref(cut off=39)		SQ design(cut off=40)		RT-PCR(M seg)		Nested RT-PCR(S seg)	
	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)
SFTS positive	32	4	35	1	22	14	33	3
SFTS negative	1	49	0	50	0	50	0	50
Total	86		86		86		86	
Sensitivity,%(95% CI)	88.89%(73.9 - 96.9)		97.22%(85.5 - 99.9)		61.1%(43.5 - 76.9)		91.67%(77.5 - 98.2)	
Specificity,%(95% CI)	98%(89.4 - 99.9)		100%(92.9 - 100.0)		100%(92.9 - 100.0)		100%(92.9 - 100.0)	
PPV, %	97.00%		100%		100%		100%	
NPV, %	92.45%		98.04%		78.13%		94.34%	
AUC	0.934(0.860 - 0.977)		0.986(0.933 - 0.999)		0.806(0.706 - 0.883)		0.958(0.892 - 0.990)	

[103] -SQ ref, 실시간 RT-PCR(S-segment,reference); SQ design, 실시간 RT-PCR(S-segment,design, 본발명)

[104]

[105] [표7]
내원 당시 검체를 이용한 PCR 진단법의 정확도의 비교

	Difference between areas	95% CI	z statistic	*p* value
SQ ref, cut off=39 - SQ design, cut off=40	0.052	0.002 - 0.101	2.033	0.004
SQ design, cut off=40 - RT-PCR, M seg	0.181	0.101 - 0.260	4.448	<0.001
SQ ref, cut off=39 - RT-PCR, M seg	0.129	0.052 - 0.206	3.292	0.001
SQ ref, cut off=39 - Nested RT-PCR, S seg	0.024	-0.028 - 0.075	0.91	0.363
RT-PCR, M seg - Nested RT-PCR, S seg	0.153	0.077 - 0.229	3.924	<0.001

[106] -SQ ref, 실시간 RT-PCR(S-segment, reference); SQ design, 실시간 RT-PCR(S-segment, design, 본원발명)

[107] 그 결과, 상기 표 6 및 도 2에 나타낸 바와 같이, SFTS의 S 단편을 타겟으로 한 실시간 RT-PCR 분석 결과, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 사용한 군이 다른 종류의 프라이머 및 프로브를 사용한 군에 비해 가장 우수한 민감도 및 특이도를 나타내었고, 구체적으로 민감도 97.2% 및 특이도 100%의 결과를 확인할 수 있었다. 한편, S 단편을 타겟으로 한 nested RT-PCR 분석에서는 91.67%의 민감도 결과를 보였으나, nested RT-PCR 은 두 번의 PCR을 수행해야 하는 번거로움이 있고, 이로 인한 PCR 오염 가능성이 더 높음을 고려할 때, 본 발명의 프라이머 및 프로브를 사용하는 것이 더 정확하고 우수한 검사결과를 도출할 수 있음을 알 수 있었다.

[108] 또한, 상기와 같은 결과에 대해, AUC를 이용해 각 민감도 및 특이도의 비교 분석에서, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용한 실시간 RT-PCR법이 M 단편을 타겟으로 한 conventional RT-PCR 보다 통계적으로도 의미 있게 정확도가 높음이 확인되었다(표 7 참조).

[109]

[110] <4-2> SFTS 의심 환자의 입원기간 동안 채혈한 검체를 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브를 이용한 PCR 진단법의 정확도 평가

[111] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용하여 SFTS 의심 환자의 입원기간 동안 환자로부터 수득한 혈액 검체를 대상으로

SFTS 검출에 대한 민감도 및 특이도 분석을 수행하였다. 구체적으로 SFTS 의 확진은 IFA 4배 이상 상승하거나 바이러스 분리 및 확인으로 정의하여, SFTS 환자로 확진된 환자 36명으로부터 119개의 혈액검체 및 타질환으로 확진된 환자 50명을 대상으로 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 정확도 검사를 수행하였다.

[112] 또한, SFTS 의심 환자의 입원기간 동안 채혈한 검체를 대상으로 분석을 수행한 것은, 보통 환자들이 증상이 발생하였으나 초기에 내원하지 않고 늦게 내원한 경우가 빈번하고, 다른 질환으로 의심하여 치료 도중에 SFTS 가 의심되어 입원기간동안 SFTS PCR 검사법을 의뢰하는 경우도 많은데, 이러한 경우 진단의 민감도가 낮아지는 문제점이 있다. 이에 환자가 입원해 있는 기간 동안이나 또는 늦게 내원한 환자의 시료를 대상으로도 높은 민감도와 특이도로 SFTS의 진단 가능성을 확인하기 위함이다.

[113] [표8]

입원 기간동안 검체를 이용한 PCR 진단법의 정확도

ALL	SFTS positive = 119 / Negative = 50							
	SQ ref(cut off=39)		SQ design(cut off=40)		RT-PCR(M seg)		Nested RT-PCR(S seg)	
	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)	Finding (+)	Finding (-)
SFTS positive	83	36	105	14	58	61	93	26
SFTS negative	1	49	0	50	0	50	0	50
Total	169		169		169		169	
Sensitivity, %(95% CI)	69.75%(60.7 - 77.8)		88.24%(81.0 - 93.4)		48.74%(39.5 - 58.1)		78.15%(69.6 - 85.2)	
Specificity(95% CI)	96.0%(86.3 - 99.5)		100.0%(92.9-100.0)		100.0%(92.9-100.0)		100.0%(92.9-100.0)	
PPV, %	98.81%		100.00%		100.00%		100.00%	
NPV, %	57.65%		78.13%		45.05%		65.79%	
AUC	0.822(0.756 - 0.876)		0.941(0.894 - 0.972)		0.744(0.671 - 0.808)		0.891(0.834 - 0.933)	

[114] -SQ ref, 실시간 RT-PCR(S-segment, reference); SQ design, 실시간 RT-PCR(S-segment, design, 본 발명)

[115] [표9]
입원 기간동안 검체를 이용한 PCR 진단법의 정확도의 비교

	Difference between areas	95% CI	z statistic	*p* value
SQ ref, cut off=39 - SQ design, cut off=40	0.119	0.068 - 0.171	4.547	<0.001
SQ ref, cut off=39 - RT-PCR, M seg	0.078	0.022 - 0.135	2.706	0.007
SQ ref, cut off=39 - Nested RT-PCR, S seg	0.069	0.017 - 0.121	2.582	0.010
SQ design, cut off=40 - RT-PCR, M seg	0.197	0.153 - 0.242	8.777	<0.001
SQ design, cut off=40 - Nested RT-PCR, S seg	0.050	0.017 - 0.084	2.916	0.004
RT-PCR, M seg - Nested RT-PCR, S seg	0.147	0.104 - 0.190	6.744	<0.001

[116] -SQ ref, 실시간 RT-PCR(S-segment, reference); SQ design, 실시간 RT-PCR(S-segment, design, 본 발명)

[117] 그 결과, 표 8~ 표 9 및 도 3에 나타낸 바와 같이, SFTS의 S 단편을 타겟으로 하며, 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하여 수행한 실시간 RT-PCR(본 발명의 방법)이 기존 real time RT-PCR법이나 nested RT-PCR법에 비해 통계적으로 의미 있게 정확도가 더 높은 것으로 나타났고, 다른 프라이머 및 프로브를 사용한 경우에 비해서도 더 우수한 민감도를 보였다.

[118]

[119] <4-3> 다양한 병원체들과 바이러스를 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브를 이용한 PCR 진단법의 정확도 분석

[120] 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용하여 도 4의 박테리아 및 바이러스를 대상으로 특이도를 분석하였다.

[121] 그 결과, 다양한 질병의 원인인 박테리아에서는 모두 음성으로 확인되었으며, 또한 SFTSV가 아닌 다른 바이러스를 대상으로 한 경우, 검출되지 않는 것으로 나타났고, 뎅기바이러스, 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스 및 한탄바이러스에 감염된 환자의 검체에서 모두 검출되지 않음을 확인하였다.

[122] 따라서 이러한 결과를 통해, 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브는 SFTS

바이러스에 대해 우수한 특이도를 보임을 알 수 있었고, 다른 박테리아 균주 및 바이러스에 대해서는 증폭산물이 검출되지 않아, SFTS 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[123]

[124] <실시예 5>

[125] 한국, 일본 및 중국 계통군의 SFTS 바이러스 검출 가능성 분석

[126] 최근 연구결과에 의하면 각 나라별 발생하는 중증열성혈소판감소증후군의 원인이 되는 SFTS 바이러스의 유전자 서열이 서로 다르다는 것이 확인되었다. 한편, 아직까지 다양한 계통군(clade)의 SFTS 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 검출기술이 개발되지 못하고 있는데, 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 각기 다양한 계통군의 SFTS 바이러스를 모두 검출가능한지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[127] 구체적으로, SFTS바이러스는 바이러스 유전자 염기서열에 따라 계통군 분석 시 Korea, Japan, China clade로 분류되는데, 우리나라 SFTS 환자는 3개국 clade가 모두 확인되고 있다. 이에 하기 표 10과 같이 각기 다른 계통군의 SFTSV에 의해 감염된 환자의 시료를 대상으로 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하여 상기 기술된 실시예에서 수행한 실시간 RT-PCR을 수행하였다. 또한, 본 발명에서 사용한 SFTSV의 계통군 및 각 시료에 대한 분류는 도 5에 나타내었다.

[128] [표10]

한국, 일본 및 중국 계통군의 SFTS 바이러스 검출 가능성 분석

Lab No.	Specimens	Viral clades	Ct(SQ-design)	log10 (copies)
2018-HY-36	WB	C2	28.34	5.12
2018-JN12	WB	C3	34.16	3.39
2018-KM23	WB	J1	36.41	2.72
2018-980	WB	J1	27.63	5.34
2018-DA02	WB	J1	27.65	5.33
2018-HY-13	WB	J1	33.15	3.69
2018-km03	WB	J1	32.12	4.00
2018-AJ27	WB	J1	34.79	3.21
2018-YN22	WB	J1	35.61	2.96
2018-KM12	WB	J1	32.68	3.83
2018-AJ28	WB	J1	34.06	3.42
2018-YN10	WB	J1	24.96	6.13
2018-WJ18	WB	J1	30.99	4.34
2018-YN05	WB	J1	37.66	2.35
2018-AJ29	WB	J1	33.36	3.63
2018-WJ06	WB	J1	31.09	4.31
2018-638	WB	J3	29.20	4.87
2018-JN44	WB	J3	33.98	3.45
2018-JN38	WB	J3	26.81	5.58
2018-CB01	WB	J3	37.89	2.28
2018-JN42	WB	J3	31.23	4.26
2018-JN17	WB	J3	30.62	4.45
2018-913	WB	K1	35.86	2.89
2018-YN03	WB	K1	26.83	5.57
2018-YN01	WB	K1	35.37	3.03
2018-JN50	WB	K1	34.09	3.41
2018-WJ01	Serum	K2	31.12	4.30
2018-HY01	WB	K3	27.41	5.40

2018-HY22	WB	K4	31.36	4.23
2018-HY-35	WB	K4	21.16	7.26
2018-HY24	WB	K4	27.5	5.37
2018-HY17	WB	K4	26.2	5.76
2018-HY06	WB	K4	29.22	4.86
2018-AJ17	WB	K4	28.21	5.16
2018-HY-29	WB	K4	31.65	4.14
2018-HY-31	WB	K4	26.8	5.58

[129] -C, Chinese clade; J, Japanese clade; K, Korean clade; SQ design, 실시간 RT-PCR (S-segment,design, 본발명)

[130] 분석 결과, 상기 표 10에 나타낸 바와 같이 3개국 clade에 감염된 모든 SFTS 환자의 시료에서 본 발명의 프라이머 및 프로브를 사용할 경우, 모두 증폭물을 확인할 수 있었고, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 방법은 한국, 일본 및 중국 계통군의 SFTS 바이러스를 모두 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[131]

[132] <실시예 6>

[133] 진드기 시료를 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 유전자 검출 또는 진단용 프라이머와 프로브를 이용한 SFTS의 검출

[134] 진드기에 물려 병원에 내원한 환자들로부터 참진드기 55개를 채취하고 이들을 대상으로 본 발명의 프라이머(서열번호 2, 3) 와 프로브(서열번호 4)를 이용하여 SFTSV에 대한 RT-PCR을 수행한 결과, 54개의 진드기 시료에서는 음성으로 확인되었으며, 1개 진드기 시료에서는 양성으로 확인되었다. Nested RT-PCR 검사상에서도 동일하게 54개의 진드기 시료에서는 음성으로 확인되었으며, 1개의 진드기에 대해서만 양성으로 확인되었고 본 발명의 실시간 RT-PCR을 시행한 결과에서도 동일하게 양성으로 확인되었으며, 염기 서열 분석 결과 SFTS 바이러스로 확인되었다(도 6 참조).

[135] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 프라이머 및 프로브는 인체 유래 시료뿐만 아니라 진드기 시료를 대상으로도 SFTSV 검출이 가능하다는 것을 알 수 있었고(SFTS SQ-PCR (ref) Ct 30.25값을 나타내었고, SFTS SQ-PCR (design) Ct 27.98값을 나타내었다)(도 6a 참조), 이러한 결과는 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 RT-PCR 분석 결과를 통해서도 SFTSV 검출이 가능하다는 것을 알 수 있었다(도 6b 참조).

[136]

[137] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 중증열성혈소판감소증후군의 원인

바이러스인 SFTS 바이러스의 S 단편 내에서 nonstructural S protein(NSs) 유전자의 염기서열을 검출 및 증폭시킬 수 있는 본 발명에서 고안된 프라이머 및 프로브를 이용하여 실시간 RT-PCR을 수행할 경우, 우리나라 뿐만 아니라 중국 및 일본에서 유행하는 유전형의 바이러스에 의해 발생하는 중증열성혈소판감소증후군도 정확하고 신속하게 검출할 수 있고 우수한 정확도도 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[138]

[139] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 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.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브;를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome; SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머쌍; 및 서열번호 4의 프로브;는 서열번호 1로 이루어진 중증열성혈소판감소증후군(Sever Fever with Thrombocytopenia Syndrome) 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는,
중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 바이러스 유전자 검출용 조성물.

[청구항 3] 제1항의 조성물을 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 진단용 키트.

[청구항 4] (1) 중증열성혈소판감소증후군의 감염이 의심되는 환자에서 분리된 시료에서 바이러스성 RNA를 분리하는 단계;
(2) 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
(3) 상기 단계 (2)에서 합성한 cDNA를 주형으로 하고, 제3항의 키트를 사용하여 실시간 RT-PCR 증폭을 수행하는 단계; 및
(4) 상기 단계 (3)을 통해 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 유전자를 확인하는 단계;를 포함하는,
중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

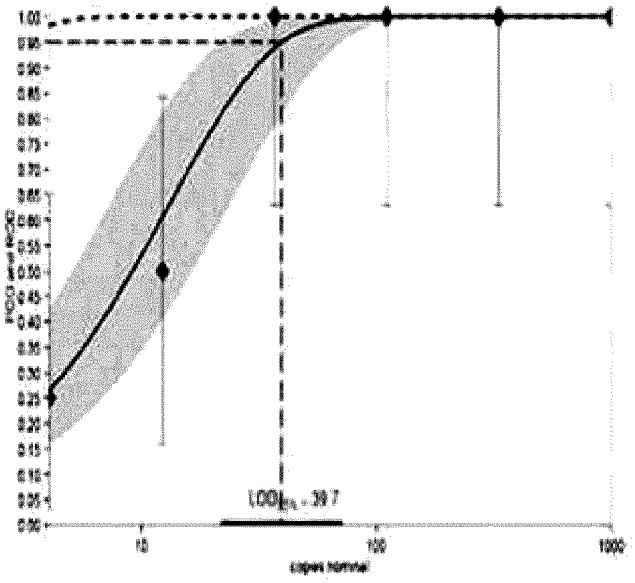
[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 단계 (1)의 시료는, 포유동물로부터 수득한 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변; 또는 참진드기;인 것을 특징으로 하는,
중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

[청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 단계 (3)에서 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 유전자의 확인은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

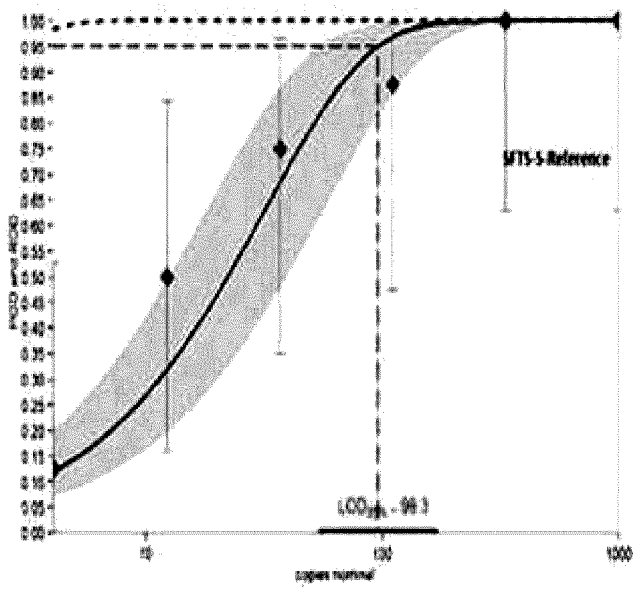
[청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 단계 (3)에서 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 유전자는 서열번호 1로 이루어진 중증열성혈소판감소증후군 바이러스의 S 단편(Small segment; S segment)인 것을 특징으로 하는,
중증열성혈소판감소증후군(SFTS) 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

[도1]

본 발명 및 참고문헌의 SFTS 바이러스 유전자 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 바이러스 검출한계 분석

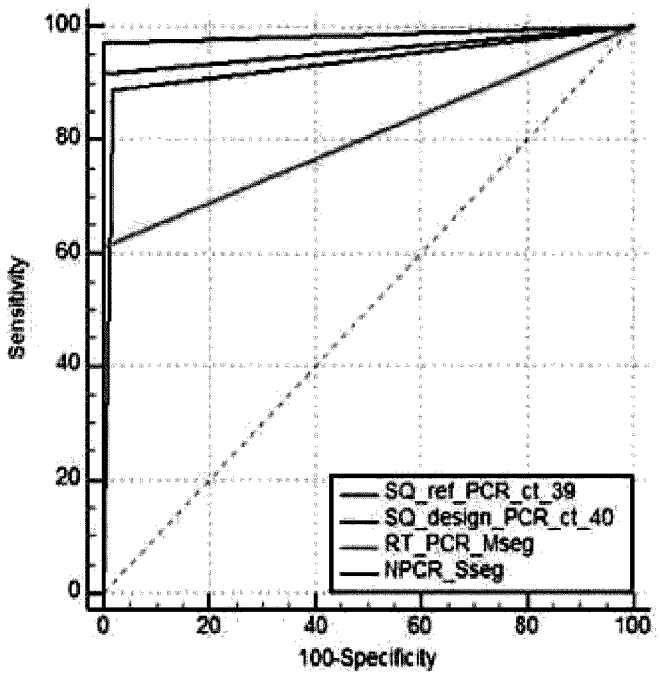


본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 민감도 분석

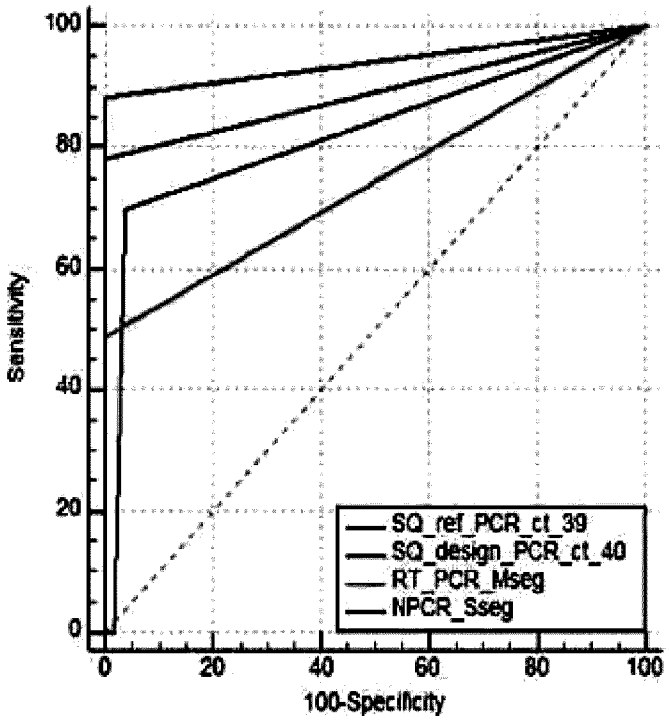


다른 서열로 이루어진 프라이머 및 프로브를 이용한 SFTS 민감도 분석

[도2]
SFTS 의심 환자의 입원 당일 수득한 검체를 대상으로 SFTS 검출 민감도 및 특이도 분석 (AUC, Area under the curve)



[도3]
SFTS 의심 환자의 입원 기간 동안 수득한 검체를 대상으로 SFTS 검출 민감도 및 특이도 분석 (AUC, Area under the curve)



[도4]

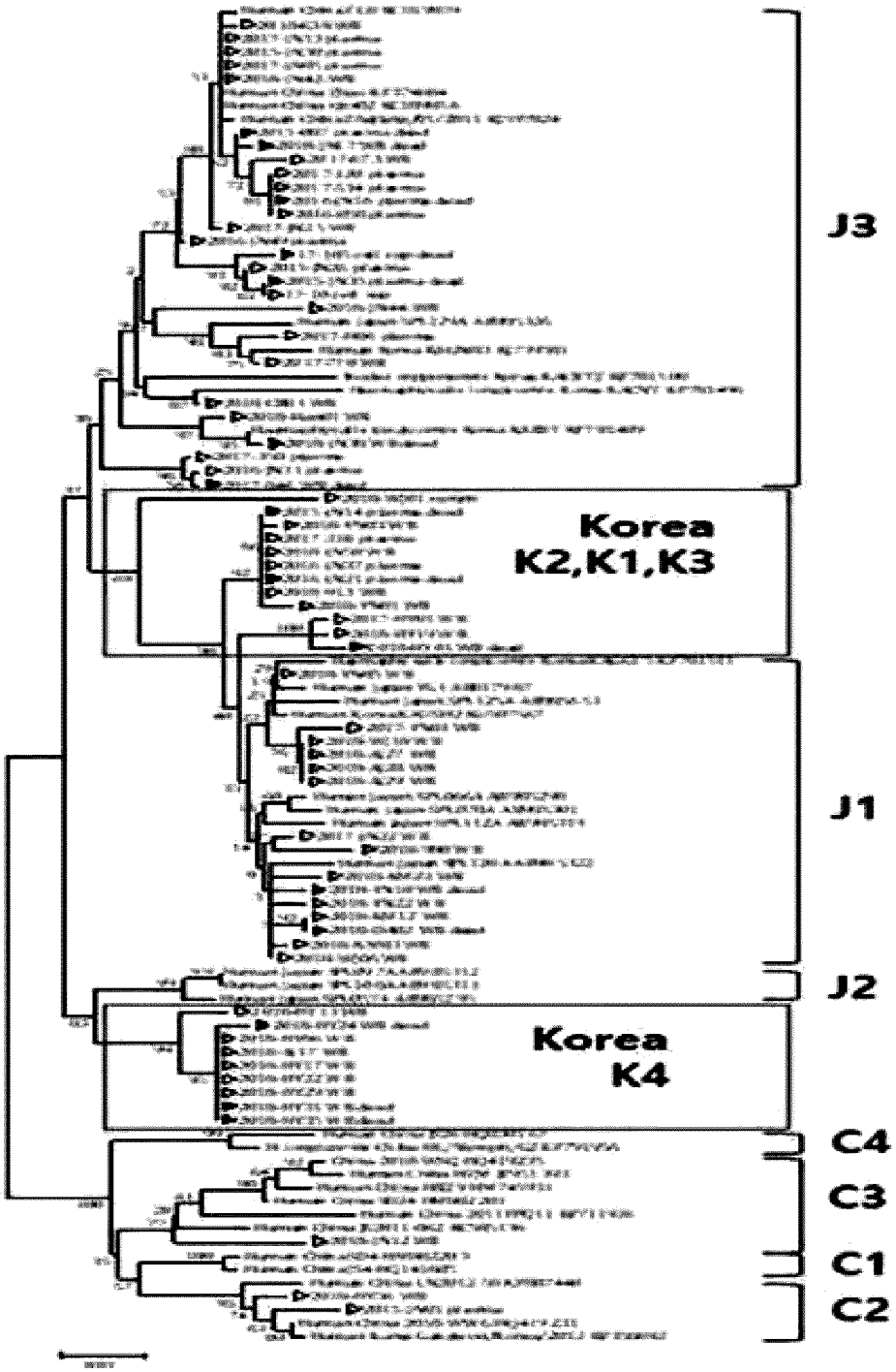
SFTS 검출특이도 분석을 위해 음성대조군으로 사용한 세균과 바이러스

Bacteria	Virus
Acinetobacter baumannii (genomic species 2)	Dengue Virus Type 1
Aeromonas hydrophila subsp. *Hydrophila*	Dengue Virus Type 2
Enterobacter aerogenes	Dengue Virus Type 3
Enterobacter sakazakii	Dengue Virus Type 4
Enterococcus faecalis	Yellow Fever virus
Escherichia coli	Zika virus
Morganella morganell subsp. *morganii*	Tick-borne Eencephalitic virus
Salmonella enterica	Japanese Eencephalitic virus
Serratia marcescens	Hantaan virus
Staphylococcus aureus subsp. *Aureus (MRSA)*	
Streptococcus pyogenes	
Streptococcus agalactiae	
Vibrio cholerae	
Vibrio parahaemolyticus	
Vibrio vulnificus	
Streptococcus mutans	
Staphylococcus aureus	
Staphylococcus epidermidis	
Staphylococcus saprophyticus subsp. *Saprophyticus*	
Salmonella typhimurium	
Klebsiella pneumoniae	
Shigella sonnei	
Pseudomonas aeruginosa	
Staphylococcus mitis	
Staphylococcus sanguinis	
Streptococcus sobrinus	
Orientia tsutsugamushi Boryong	
Orientia tsutsugamushi Karp	
Orientia tsutsugamushi Kato	
Orientia tsutsugamushi Gilliam	
Rickettsia akari	
Ehrlichia chaffensis	
Ehrlichia canis	
Anaplasma phagocytophilum	
Anaplasma ovis	
Anaplasma marginale Theiler	
Bartonella henselae	
Bartonella elizabethae	
Bartonella quintana	
Leptospira broomii	
Leptospira fainei	
Leptospira hovindhougenii	
Leptospira interrogans	
Leptospira kirschneri	
Leptospira kmetyi	
Leptospira licerasiae	
Leptospira meyeri	
Leptospira noguchii	
Leptospira wolbachii	
Leptospira wolffii	
Leptospira biflexa	

[도5]

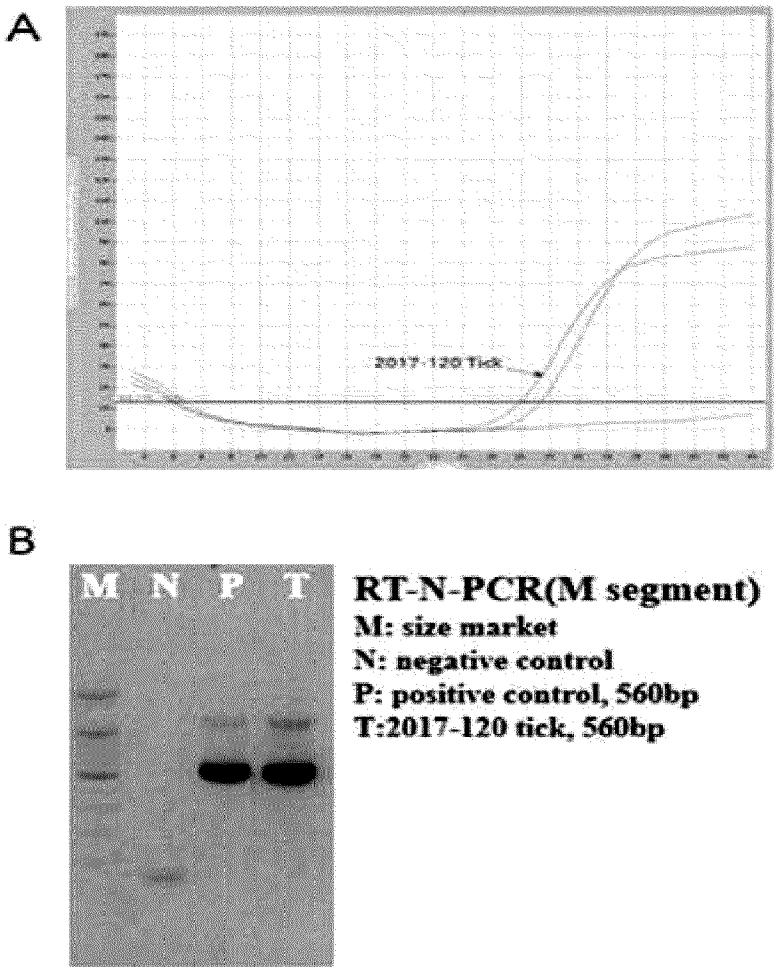
SFTS 바이러스의 M 단편 염기서열을 토대로 제작한 SFTSV의 계통수

Korea clade (K1~K4), Japan clade (J1~J3) 및 China clade(C1~C4)로 분류



[도6]

6A는 참진드기 시료를 대상으로 본 발명의 프라이머 및 프로브를 이용하여 실시간 RT-PCR 분석이고, 6B는 RT-PCR 분석 결과임



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/009829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/70(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 1/70; C12N 7/01; C12Q 1/68

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: 중증열성혈소판감소증후군(severe fever with thrombocytopenia syndrome), 바이러스(virus), 프라이머쌍(primer set), 프로브(probe)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0063890 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 10 June 2019. See claims 1-7.	1-7
A	KR 10-2017-0075043 A (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL RESEARCH) 03 July 2017. See entire document.	1-7
A	KR 10-1728420 B1 (KOREA DISEASE CONTROL AND PREVENTION AGENCY) 21 April 2017. See entire document.	1-7
A	KR 10-2017-0107720 A (LEE, Mee Young) 26 September 2017. See entire document.	1-7

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
28 October 2020	**29 October 2020**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea** **35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0042419 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 21 April 2015. See entire document.	1-7
A	CN 105296674 A (JIANGSU PROVINCIAL CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) 03 February 2016. See entire document.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/009829

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0063890 A	10 June 2019	KR 10-2145657 B1	18 August 2020
KR 10-2017-0075043 A	03 July 2017	KR 10-1764321 B1	04 August 2017
KR 10-1728420 B1	21 April 2017	None	
KR 10-2017-0107720 A	26 September 2017	KR 10-1786311 B1	17 October 2017
KR 10-2015-0042419 A	21 April 2015	KR 10-1630499 B1	15 June 2016
		WO 2015-053455 A1	16 April 2015
CN 105296674 A	03 February 2016	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/009829

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/70(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/70; C12N 7/01; C12Q 1/68

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: 중증열성혈소판감소증후군(severe fever with thrombocytopenia syndrome), 바이러스(virus), 프라이머쌍(primer set), 프로브(probe)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0063890 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2019.06.10 청구항 1-7	1-7
A	KR 10-2017-0075043 A (대한민국 (관리부서 : 환경부 국립환경과학원장)) 2017.07.03 전체 문헌	1-7
A	KR 10-1728420 B1 (대한민국) 2017.04.21 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2017-0107720 A (이미영) 2017.09.26 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2015-0042419 A (서울대학교산학협력단) 2015.04.21 전체 문헌	1-7
A	CN 105296674 A (JIANGSU PROVINCIAL CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) 2016.02.03 전체 문헌	1-7

☐ 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 가지나 국제출원일 이후에 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	국제조사보고서 발송일
2020년 10월 28일 (28.10.2020)	2020년 10월 29일 (29.10.2020)

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/009829

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0063890 A	2019/06/10	KR 10-2145657 B1	2020/08/18
KR 10-2017-0075043 A	2017/07/03	KR 10-1764321 B1	2017/08/04
KR 10-1728420 B1	2017/04/21	없음	
KR 10-2017-0107720 A	2017/09/26	KR 10-1786311 B1	2017/10/17
KR 10-2015-0042419 A	2015/04/21	KR 10-1630499 B1 WO 2015-053455 A1	2016/06/15 2015/04/16
CN 105296674 A	2016/02/03	없음	