

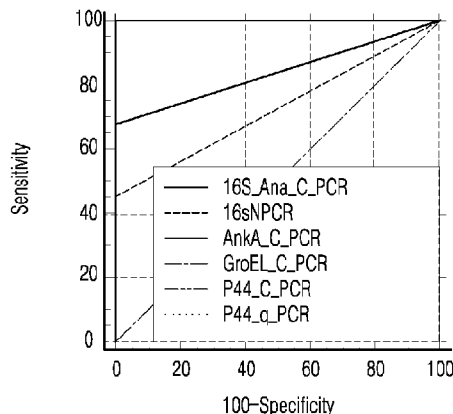


- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6883* (2018.01) *G01N 33/569* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/005252
- (22) 국제출원일: 2020 년 4 월 21 일 (21.04.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0049225 2019 년 4 월 26 일 (26.04.2019) KR
- (71) 출원인: 조선대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김동민 (KIM, Dong Min); 61704 광주시 남구 봉선중앙로 6, 101동 302호, 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, 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: USE OF P44 AS MARKER FOR DIAGNOSING ANAPLASMOSIS

(54) 발명의 명칭: 아나플라즈마병의 진단용 마커로서 P 4 4 의 용도



Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
16S_Ana_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
16sNPCR	0.846	0.0666	0.660 to 0.954
AnkA_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
GroEL_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
P44_C_PCR	0.846	0.0666	0.660 to 0.954
P44_q_PCR	1.000	0.000	0.877 to 1.000

(57) Abstract: The present invention relates to a new use of P₄₄ as a marker for predicting or diagnosing anaplasmosis. Particularly, the present invention relates to a composition for a diagnostic marker for anaplasmosis comprising a P₄₄ gene, a composition for diagnosing anaplasmosis, a primer set or probe for detecting *Anaplasma phagocytophilum*, a diagnostic kit, and a method for providing information for diagnosing an anaplasmosis infection. P₄₄, which is a new biomarker for diagnosing anaplasmosis, discovered by the present invention, is a multicopy gene, multiple copies of which exist in an *Anaplasma phagocytophilum* genome, and thus has the benefit of being detectable with high sensitivity even with a small amount of DNA compared to conventional diagnostic marker genes. A primer set or probe for detecting or amplifying P₄₄, devised in the present invention, shows high sensitivity even with a short testing time and can thus be very usefully used in early diagnosis of anaplasmosis.

(57) 요약서: 본 발명은 아나플라즈마병의 예측 또는 진단용 마커로서 P₄₄의 신규용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 P₄₄ 유전자를 함유하는 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물, 아나플라즈마병 진단용 조성물, 아나플라즈마 파괴사이토펠리움 검출용 프라이머 세트 또는 프로브, 진단키트 및 아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에서 발굴한 아나플라즈마병 진단을 위한 신규 바이오마커인 P₄₄는 다복제 유전자(multicopy gene)로서 아나플라즈마 파괴사이토펠리움 게놈에 많은 카피로 존재하고 있어 종래 진단마커 유전자들에 비해 소량의 DNA 만으로도 높은 민감도로 검출이 가능한 효과가 있고, 본 발명에서 고안한 P₄₄ 검출 및 증폭용 프라이머 세트 또는 프로브는 짧은 검사 시간만으로도 높은 민감도를 보이므로, 아나플라즈마병의 조기 진단에 매우 유용하게 사용할 수 있다.

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 아나플라즈마병의 진단용 마커로서 P 4 4 의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 아나플라즈마병의 예측 또는 진단용 마커로서 P₄₄의 신규용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아나플라즈마병은 급성 발열성 질환으로 아나플라즈마 파고사이토피리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 균에 의해 감염된 진드기에 물려 전염되며, 비특이적인 급성 발열성 임상 양상을 나타낸다. 젊은 성인의 경우 경미한 증상이 나타나지만 고령이거나 면역저하자의 경우에는 혈소판 및 백혈구 감소증, 간 기능 효소 수치 상승 및 심각한 증상이 발생할 수 있다. 아나플라즈마병은 항생제 치료에 잘 반응하나, 진단이 늦어질 경우 합병증으로 일부 환자에서는 사망이 초래될 수 있다. 그러므로 신속하고 정확한 진단이 환자의 예후 개선을 위해 필수적이다.
- [3] 현재, 아나플라즈마병의 진단은 환자의 혈액으로부터 *A. phagocytophilum*를 배양 분리하여 확인하는 방법, 초기 단계에 말초 혈액을 이용하여 Wright 또는 Giemsa 염색을 통해 말초혈액 표본에서 상실배(Morulae)를 관찰하는 방법, 환자의 혈청 내에서 *A. phagocytophilum*에 대한 항체를 통한 검출방법 등이 있다.
- [4] 그러나 *A. phagocytophilum*을 배양하여 질병을 진단하는 방법은 배양에 필요한 시간이 수주 이상 요구되고 있어 실제 환자의 진단 목적으로는 적합한 방법이 아니며, 혈청학적 검사인 간접 면역형광 항체법, 면역 효소법의 경우, 다른 병원체와의 교차 반응으로 위양성 반응이 있고, 증상 발생 후 항체 형성까지 수일이 소요되어 질병의 조기 검사 수행 시, 민감도가 낮으며 확진을 위해서는 추적 검사가 필요하다는 단점이 있다.
- [5] 또한, Anaplasmosis 환자를 대상으로 하는 임상 연구에서 Anaplasmosis의 진단 기준을 매우 낮은 IgM 1:16 이상, IgG 1:80 이상으로 cutoff value를 이용하였을 때 증상 발생 후 1주에 내원한 경우 IgM의 민감도는 23%, IgG의 민감도는 15%로 매우 낮은 결과를 보임에 따라, 현재의 진단 방법은 신속성 및 정확성이 낮다는 문제가 있다.
- [6] 나아가, 종래 아나플라즈마병의 진단을 PCR 진단법으로 확인하고자, 진단용 바이오 마커로서 16S rRNA, ankA, groEL이 타겟 단백질유전자(target protein gene)를 이용한 PCR이 시도되었으나, 이들 유전자들을 진단마커로 할 경우, 컨벤셔널 PCR 보다는 네스티드 PCR 및 리얼 타임 PCR법을 사용해야만 하는 불편함이 있다. 이는 *A. phagocytophilum*은 세포내 세균으로 컨벤셔널 PCR을 시행할 경우, 민감도가 낮기 때문인데, 다만, 네스티드 PCR을 수행하는 경우 PCR을 두 번 시행함으로써 민감도를 상승시킬 수 있으며, 2회의 PCR을

수행해야 하는 번거로움이 있으며, 필요 이상의 인력과 시간이 소요되고, 잠재적인 오염가능성이 더 높아 단 한번으로도 민감도가 우수한 새로운 진단법의 개발이 매우 절실한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에 본 발명자들은 아나플라즈마병을 신속하고 정확하게 높은 민감도로 진단할 수 있는 새로운 바이오마커로서 다복제 유전자(multicopy gene)인 P₄₄를 이용할 수 있음을 규명하였고, 아나플라즈마병을 검출할 수 있는 프라이머 세트 및 이를 포함하는 키트를 고안함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [8] 따라서 본 발명의 목적은 P₄₄ 유전자를 함유하는 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 P₄₄ 유전자 또는 P₄₄ 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 아나플라즈마 파고사이토피리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 검출용 프라이머 세트 또는 프로브를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 아나플라즈마병 진단용 조성물을 포함하는 아나플라즈마병 진단 키트를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 아나플라즈마병 진단 키트를 사용하여 아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, P₄₄ 유전자를 함유하는 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 P₄₄ 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [15] 또한 본 발명은 P₄₄ 유전자 또는 P₄₄ 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물을 제공한다.
- [16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 P₄₄ 유전자의 수준을 측정하는 물질은 P₄₄ 유전자 또는 P₄₄ mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는, 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군 중에서 선택되는 프라이머 세트이고, 상기 프로브는 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 프로브일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 P₄₄ 단백질의 수준을 측정하는 물질은 P₄₄

단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

- [19] 또한 본 발명은, 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 아나플라즈마 파고사이토펙리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 검출용 프라이머 세트를 제공한다.
- [20] 또한 본 발명은, 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는, 아나플라즈마 파고사이토펙리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 검출용 프로브를 제공한다.
- [21] 또한 본 발명은 본 발명의 아나플라즈마병 진단용 조성물을 포함하는 아나플라즈마병 진단 키트를 제공한다.
- [22] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 진단 키트는, 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 프로브; 중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [23] 또한 본 발명은 본 발명의 진단용 조성물을 포함하는 아나플라즈마병 진단 키트를 사용하여 아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아나플라즈마병 진단 키트는 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트;로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 프라이머 세트; 또는 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 프로브;를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 진단은 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 루프매개 등온증폭방법(LAMP:Loop-mediated Isothermal Amplification)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [26] 본 발명에 따른 아나플라즈마병 진단을 위한 신규 바이오마커인 P₄₄는 다복제 유전자(multicopy gene)로서 아나플라즈마 파고사이토펠리움 계통에 많은 카피수로 존재하고 있어 종래 진단마커 유전자들에 비해 소량의 DNA 만으로도 높은 민감도로 아나플라즈마의 감염 여부를 검출할 수 있는 효과가 있고, 본 발명에 따른 P₄₄ 검출 및 증폭용 프라이머 세트 또는 프로브는 신속하고 간단하며 높은 특이도와 민감도로 아나플라즈마 감염여부를 확인할 수 있어, 아나플라즈마의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 본 발명의 아나플라즈마병 진단용 신규 마커인 P₄₄와 종래 마커들을 이용하고 다양한 PCR 방법을 수행하여 아나플라즈마병 진단의 민감도를 비교 분석한 결과(ROC 커브)를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명은 아나플라즈마병을 조기에 정확하고 신속하게 진단할 수 있는 새로운 바이오마커로서 P₄₄를 사용할 수 있음을 규명한 점에 특징이 있다.
- [29] 특히 본 발명자들은 아나플라즈마병의 진단의 신속성과 정확성을 더욱 향상시킬 수 있는 방법을 연구하던 중, *A. phagocytophilum*에 존재하는 다복제유전자인 P₄₄를 아나플라즈마병 진단을 위한 새로운 바이오마커로 사용할 수 있음을 규명하였다.
- [30] 본 발명에서 특히, 새로운 바이오마커의 발굴 대상을 다복제유전자(multicopy gene)로 타겟하였는데, 이는 다복제유전자의 경우 유전자 집단(gene cluster)에서 반복서열로 존재하여 많은 카피가 한 세포에 존재하기 때문에 민감도가 매우 높아질 수 있을 것으로 판단하였고, 따라서 다복제유전자를 표적으로 하여 *A. phagocytophilum*를 검출할 수 있는 바이오마커를 스크리닝하였다.
- [31] 그 중에서, 다른 다복제유전자들에 비해 P₄₄를 마커로 사용할 경우, *A. phagocytophilum*를 높은 민감도로 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [32] 따라서 본 발명은 P₄₄ 유전자를 함유하는 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물을 제공한다.
- [33] 상기 아나플라즈마병, 즉 아나플라즈마증(Human granulocytic anaplasmosis, HGA)은 인수공통 감염병으로 알려져 있으며, 사람을 포함한 개, 소, 양, 염소, 말 및 야생동물에 감염되며, 원인병원체는 *Anaplasma phagocytophilum*이라는 세포내 절대 기생하는 박테리아이다.
- [34] 따라서 본 발명의 아나플라즈마병은 *Anaplasma phagocytophilum*의 감염에 의해 유발되는 질환을 말한다.
- [35] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료

효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

- [36] 본 발명에서 용어 "마커"란 *Anaplasma phagocytophilum*의 감염 여부를 판정할 수 있는 물질 또는 *Anaplasma phagocytophilum*의 감염에 의한 아나플라즈마병 발생 개체를 정상 개체와 구분하여 판정할 수 있는 물질을 말하며, 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 아나플라즈마병 진단 마커는 P₄₄ 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질 일 수 있다.
- [37] 바람직하게, 상기 본 발명의 P₄₄ 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 유전자로부터 발현된 P₄₄ 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [38] 또한, 본 발명은 P₄₄ 유전자 또는 P₄₄ 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물을 제공한다.
- [39] 즉, 상기 진단용 조성물은 아나플라즈마증의 병원체인 *Anaplasma phagocytophilum*을 검출할 수 있으며, 상기 검출은 중합효소 연쇄반응(PCR)에 사용될 수 있다.
- [40] 상기 P₄₄ 유전자의 수준을 측정하는 물질은 P₄₄ 유전자 또는 P₄₄ mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 바람직하게 상기 프라이머는, 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군 중에서 선택되는 프라이머 세트이고, 상기 프로브는 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 프로브일 수 있다.
- [41] 또한, 상기 P₄₄ 단백질의 수준을 측정하는 물질은 P₄₄ 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.
- [42] 상기 본 발명의 진단용 조성물은 상기에서 언급한 각각의 프라이머 세트 또는 프로브 이외에 중합효소 연쇄반응(PCR)에 사용할 수 있는 성분, 예를 들면 반응용 완충용액, dNTP, Mg²⁺ 이온, DNA 중합효소를 포함할 수 있다.
- [43] 상기 반응용 완충용액은 1~10mM TrisHCl, 10~40mM KCl(pH9.0)을 사용할 수 있고, 상기 dNTP는 dATP, dTTP, dGTP, dCTP 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [44] 상기 진단용 조성물은 실험상의 편의, 안정화 및 반응성 향상을 위해 안정화제 및/또는 비반응성 염료 등을 포함할 수 있다.
- [45] 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.

- [46] 상기 진단용 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.
- [47] 상기 진단용 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.
- [48] 상기의 진단용 조성물은 프라이머 세트 또는 프로브를 제외한 나머지 성분인 반응용 완충용액, dNTP, Mg^{2+} 이온, DNA 중합효소들이 이미 함유된 시중에 판매되는 제품을 사용할 수 있다.
- [49] 본 발명은 나아가 아나플라즈마 파고사이토피리움(*Anaplasma phagocytophilum*)을 특이적으로 검출할 수 있는 아나플라즈마 파고사이토피리움 검출용 프라이머 세트 또는 아나플라즈마 파고사이토피리움 검출용 프로브를 제공할 수 있다.
- [50] 본 발명에 따른 상기 프라이머 또는 프로브는 아나플라즈마 파고사이토피리움을 신속하고 정확하게 검출하기 위해 본 발명에서 규명한 P₄₄에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 바람직하게 상기 프라이머는 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [51] 또한 바람직하게 상기 프로브는 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [52] 특히 본 발명에서 고안한 상기 프라이머 또는 프로브는 아나플라즈마 파고사이토피리움을 초기에 신속하고 정확하게 검출할 수 있기 위해 고안된 것으로, 다복제 유전자 P₄₄에 특이적으로 결합 및/또는 증폭할 수 있으며, 중합효소 연쇄반응(PCR)에 유용하게 사용될 수 있도록 제작하였다.
- [53] 나아가 본 발명은 아나플라즈마병 진단 키트, 즉 아나플라즈마 파고사이토피리움을 검출할 수 있는 검출용 진단 키트를 제공한다.
- [54] 상기 진단 키트에는 앞서 기술한 본 발명의 아나플라즈마병 진단용 조성물을 포함한다.

- [55] 또한 본 발명은 본 발명의 아나플라즈마병 진단 키트를 사용하여 아나플라즈마 파고사이토피리움의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [56] 구체적으로는, 상기 기술한 본 발명의 진단용 조성물에 아나플라즈마병 의심 개체로부터 수득한 생물학적 시료에서 분리한 DNA 함유 시료를 혼합하는 단계; 및 반응 혼합물이 증폭될 수 있도록 반응을 수행하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는, 아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [57] 상기 진단용 조성물에는 본 발명에서 제작한 상기 기술된 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하고, 상기 반응 혼합물이 증폭될 수 있도록 반응을 수행하는 것은 중합효소 연쇄반응(PCR) 방법으로 수행할 수 있다.
- [58] 또한 상기 진단을 위한 분석 방법은 이에 제한되지는 않으나, 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 루프매개 등온증폭방법(LAMP:Loop-mediated Isothermal Amplification)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법으로 수행할 수 있다.
- [59] 상기 아나플라즈마병 의심 개체는 아나플라즈마 파고사이토피리움 군에 감염되었거나 감염이 의심되는 개체로서, 진드기, 쥐, 야생동물, 소, 돼지, 양, 염소, 사슴, 말등의 가축, 개, 고양이등의 반려동물 또는 사람일 수 있다.
- [60] 상기 생물학적 시료는 상기 개체의 체액 또는 분비물일 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예컨대 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 뇌척수액, 조직액 등, 또는 체외로 분비되는 분비물인 소변, 눈물, 침, 젖, 구토물, 및 분변 등을 포함하며, 바람직하게는 혈액이 될 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] 아나플라즈마병 검출 또는 진단을 위한 프라이머 및 프로브 제작
- [65] 본 발명자들은 아나플라즈마병을 신속하고 정확하며 높은 민감도로 검출할 수 있는 새로운 바이오 마커를 발굴하기 위해 연구하던 중, 조선대학교 병원에 내원하여 *A. phagocytophilum* 군주에 감염되어 아나플라즈마병으로 확진된 환자들로부터 수득한 혈액에서 정상인과 발현의 차이를 보이며 *A. phagocytophilum* 군주 특이적으로 존재하는 다복제 유전자들 중에서 아나플라즈마병의 진단용 바이오마커로서 사용 가능할 수 있는 타겟

유전자로서 P₄₄를 선별한 후, P₄₄를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 및 프로브들을 하기 표 1과 같이 제작하였으며, 특히 하기 표 1에 기재된 본 발명의 프라이머 및 프로브들은 간단한 PCR 수행만으로도 아나플라즈마병을 높은 민감도로 진단할 수 있기 위해 디자인 하였다.

[표1]

Assay Name	Primer, Probes	Base Sequence	Position	Length	Tm	서열번호	Product
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	CACCACCAATACCATAACCAACACTG	214	26	69	16	
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	TACCATAACCAACACTGCCTTCCATA	205	26	69	17	
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	CAATACCATAACCAACACTGCCTTCC	208	26	69.1	18	
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	CCAATACCATAACCAACACTGCCTTC	209	26	69.1	19	
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	ATACCATAACCAACACTGCCTTCCATA	206	27	69.1	20	
Ana P44	Sense Primer	GGATGGAAAGAGTGTAAG	90	19	59.1	3	154
Ana P44	Anti-sense Primer	CTCGTAACCAATCTCAAG	243	18	58.5	4	
Ana P44	Anti-sense Probe	TACCATAACCAACACTGCCTTCCA	205	24	69.2	21	
Ana P44	Sense Primer	GCTATGGAAGGAGTGTTGG	178	20	55.98	5	73
Ana P44	Anti-sense Primer	TGAAGCGCTCGTAACCAATC	231	20	55.77	6	
Ana P44	Anti-sense Probe	AGCTCAACCTGGCACCACCA	207	21	63.17	22	
Ana P44	Sense Primer	ACAGTCCAGCGTTTAGCAAG	8	20	55.59	7	190
Ana P44	Anti-sense Primer	CCAACACTGCCTTCCATAGC	178	20	55.98	8	
Ana P44	sense Probe	TGACTGGAACACTCCTGATCCTCGGA	126	26	62.7	23	
Ana P44	Sense Primer	CCTGATCCTCGGATTGGGTT	139	20	56.16	9	81
Ana P44	Anti-sense Primer	CCTGGCACCACCAATACCAT	200	20	57.02	10	
Ana P44	Anti-sense Probe	CCAACACTGCCTTCCATAGCTACAAGC	171	27	62.02	24	
Ana P44	Sense Primer	CCTGATCCTCGGATTGGGTT	139	20	56.16	9	117
Ana P44	Anti-sense Primer	GGTCTGAAGCGCTCGTAAC	236	20	56.45	11	
Ana P44	Anti-sense Probe	AGCTCAACCTGGCACCACCA	207	21	63.17	25	
Ana P44	Sense Primer	TATTGGTGGTGCCAGGGTT	204	19	55.97	12	156
Ana P44	Anti-sense Primer	AGGTTATCAGTGTGCCAGT	340	20	55.02	13	
Ana P44	Anti-sense Probe	ACCCTTGGTCTTGAAGCGCTCGT	239	23	63.22	26	
Ana P44	Sense Primer	ACAAGTTTGACTGGAACACTCC	119	22	55.47	14	101
Ana P44	Anti-sense Primer	CCTGGCACCACCAATACCAT	200	20	57.02	15	
Ana P44	Anti-sense Probe	CCAACACTGCCTTCCATAGCTACAAGC	171	27	62.02	27	

[67]

[68] <실시예 2>

[69] 본 발명의 아나플라즈마병 검출용 프라이머 및 프로브를 이용한 검출 민감도 분석

[70] 상기 실시예 1에서 고안한 본 발명의 아나플라즈마병 검출용 프라이머 및 프로브가 실제 아나플라즈마병을 신속하고 높은 민감도로 검출할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[71] 이를 위해 먼저, 2016년부터 2017년 동안 조선대학교 병원에 내원한 환자를 대상으로, 아나플라즈마증으로 확진된 환자 15명의 혈액 및 아나플라즈마증이 아닌 타질환으로 진단된 환자 15명의 혈액을 이용하여 검사를 수행하였다.

[72] 이때 상기 아나플라즈마증으로 확진된 환자는 양성대조균인 *A. phagocytophilum*에 대한 면역 형광 항체 검사법(IFA) 항체가 검사 시, 4배 이상 상승한 경우를 아나플라즈마병 확진으로 정의하였고, 확진된 환자 15명으로부터 수득한 혈액을 이용하였다. 또한 음성대조균은 *A. phagocytophilum*에 대한 면역 형광 항체 검사법(IFA) 수행 시, 항체가 확인되지 않으며 아나플라즈마병이 아닌 타질환으로 진단된 환자 15명으로부터 수득한 혈액을 이용하였다. 상기 수득한 각 혈액 시료들은 원심분리 후 buffy coat를 채취하여 게놈 유전자를 추출하였고, 상기 표 1에 기재된 본 발명의 프라이머 또는 프로브를 이용하여 PCR을 수행함으로써, 아나플라즈마병의 진단 가능성 및 민감도를 분석하였다. 또한, 이때 비교균으로 종래 아나플라즈마병 진단 마커로 알려진 16S rRNA(Genbank :CP000235), ankA(Genbank : AF020521) 및 groEL-STG(Genbank :CP000235) 유전자를 주형 DNA로 하고, 이에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 분석을 수행함으로써 본 발명에서 규명한 신규 바이오마커인 P₄₄ 및 이의 검출용 프라이머와 프로브에 대한 검출 민감도를 비교 분석하였다.

[73] [표2]

PCR 방법	Groel C-PCR		AnkA PCR		16S PCR		MSP2 C-PCR		P44 C-PCR		16S N-PCR		P44 Q-PCR	
	Case	Control	Case	Control	Case	Control	Case	Control	Case	Control	Case	Control	Case	Control
Test positive	6	0	6	0	6	0	6	0	11	0	11	0	15	0
Test negative	9	15	9	15	8	15	9	15	4	15	4	15	0	15
Total	15	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Sensitivity, %(95% CI)	40(17-67)		40(17-67)		43(19-70)		43(19-70)		73(45-91)		73(45-91)		100(75-100)	
Specificity, %(95% CI)	100(75-100)		100(74-100)		100(74-100)		100(75-100)		100(75-100)		100(75-100)		100(75-100)	
PPV, %(95% CI)	100(52-100)		100(52-100)		100(52-100)		100(52-100)		100(68-100)		100(68-100)		100(75-100)	
NPV, %(95% CI)	63(41-80)		63(41-80)		65(43-83)		65(43-83)		79(54-93)		79(54-93)		100(75-100)	
Time	3-4h		3-4h		3-4h		3-4h		3-4h		6-7h		1-2h	

[74] 또한, 상기 실험을 위해 사용한 각 프라이머 서열은 하기 표 3에 기재하였으며, 각 PCR 수행 조건은 하기 표 4 및 표 5에 기재된 조건에 따라 수행하였다.

[75] [표 3]

PCR	Primer	Primer Name	Primer Sequence	서열 번호	산물 크기 (bp)
groEL N-PCR 1 st PCR	1 st Forward	GRO607F	GAAGATGCWGTWGGWTGTACKGC	28	688
	1 st Reverse	GRO1294R	AGMGCTTCWCCTTCWACRTCCTC	29	
groEL N-PCR 2 nd PCR/C-PCR	2 nd Forward	GRO677F	ATTACTCAGAGTGCTTCTCARTG	30	445
	2 nd Reverse	GRO1121R	TGCATACCRTCACTGTTTTCAAC	31	
ankA N-PCR 1 st PCR	1 st Forward	ANK-F1	GAAGAAATTACAACCTCTGAAG	32	705
	1 st Reverse	ANK-R1	CAGCCAGATGCAGTAACGTG	33	
ankA N-PCR 2 nd PCR/C-PCR	2 nd Forward	ANK-F2	TTGACCCTGAAGCACTAAC	34	664
	2 nd Reverse	ANK-R2	ACCATTGCTTCTTGAGGAG	35	
16s N-PCR 1 st PCR	1 st Forward	AE1-F	AAGCTTAACACATGCAAGTCGAA	36	1406
	1 st Reverse	AE1-R	AGTCACTGA CCCAACCTTAAATG	37	
16s N-PCR 2 nd PCR/C-PCR	2 nd Forward	EE-3	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC	38	926
	2 nd Reverse	EE-4	CCCTTCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	39	
msp2(P44) C-PCR	Forward	msp2F	ATGTCCATGGCTATAGTCATGGCTG	40	430
	Reverse	msp2R	ACCTCGAGTTAAGCTAACTCCTTAGCT	41	
msp2 N-PCR 1 st PCR	1 st Forward	Anapmsp21F	TTATGATTAGGCCCTTTGGGCATG	42	1079
	1 st Reverse	Anapmsp21R	TCAGAAAGATACACGTGCGCCC	43	
msp2 N-PCR 2 nd PCR	2 nd Forward	Anapmsp22F	GGTTACATAAGGGCCGCAAAGGTG	44	467
	2 nd Reverse	Anapmsp22R	CCGGCGCATGTGTAAGGTGAAA	45	
P44 Q-PCR	Forward	anaP44 90F	GGATGGAAAGAGTGTAAG	46	153
	Reverse	anaP44 243R	CTCGTAACCAATCTCAAG	47	
	Probe	anaP44 anti-214P	[TET]CACCACCAATACCATAACCAACACT[BHQ1]	48	

[76] [표4]

Step	groEL N-PCR 1stPCR		groEL N-PCR 2ndPCR/C-PCR		ankA N-PCR 1stPCR		ankA N-PCR 2ndPCR/C-PCR	
	Temperature	Time	Temperature	Time	Temperature	Time	Temperature	Time
1	95	5m	95	5m	95	5m	95	5m
2	95	30s	95	30s	95	30s	95	30s
3	54	30s	50	30s	53	30s	52	30s
4	72	90s	72	60s	72	60s	72	60s
5	Step2	35 cycle	Step2	5 cycle	Step2	35 cycle	Step2	5 cycle
6	72	5m	95	30s	72	5m	95	5m
7			53	30s			54	30s
8			72	60s			72	30s
9			Step6	5 cycle			Step6	60s
10			95	30s			72	5m
11			57	30s				
12			72	60s				
13			Step10	25 cycle				
14			72	5m				

[77] [표5]

Step	16s N-PCR 1 st PCR		16s N-PCR 2 nd PCR/C-PCR		msp2(P44) C-PCR	
	Temperature	Time	Temperature	Time	Temperature	Time
1	95	5m	95	5m	95	5m
2	95	30s	95	30s	95	30s
3	59	30s	56	30s	56	30s
4	72	90s	72	60s	72	60s
5	Step2	35 cycle	Step2	30 cycle	Step2	35 cycle
6	72	5m	72	5m	72	5m
Step	msp2 N-PCR 1 st PCR		msp2 N-PCR 2 nd PCR		P44 Q-PCR	
	Temperature	Time	Temperature	Time	Temperature	Time
1	95	5m	95	5m	95	5m
2	95	30s	95	30s	95	5s
3	54	30s	57	30s	51	5s
4	72	60s	72	60s	Scan	TET
5	Step2	35 cycle	Step2	35 cycle	Step2	45 cycle
6	72	5m	72	5m	25	1m

[78] 분석결과, 상기 표 2 및 도 1에 나타난 바와 같이, PCR 수행 결과 음성대조군 15개의 시료에서는 PCR 증폭산물이 전혀 관찰되지 않았으며, 아나플라즈마증 확진 환자의 혈액에서는 PCR 증폭산물이 확인되었으나, 비교군으로 사용한 타겟 유전자들(16S rRNA, ankA, groEL-STG)은 검출 결과를 확인하기까지 3~7시간의 시간이 소요되는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 프라이머를 이용하여 새로운 바이오마커인 P44의 검출까지는 1~2시간의 짧은 시간이 소요되는 것을 확인할 수 있었다.

[79] 또한, 본 발명의 신규 바이오마커인 P44의 검출을 통한 아나플라즈마병의 진단 민감도는 본 발명에서 고안한 프라이머를 사용한 경우, 100%의 민감도(Sensitivity)를 보이는 것으로 나타나 민감도 및 정확도가 매우 높다는

것을 알 수 있었다. 반면 종래 사용되었던 타겟 유전자들(16S rRNA, ankA, groEL-STG)의 검출을 통한 진단은 낮은 민감도를 보이는 것으로 나타났다.

- [80] 또한, 본 발명의 P₄₄ 유전자를 이용하여 C-PCR을 수행한 경우, 다른 타겟 유전자들을 대상으로 N-PCR을 수행한 것에 비해 분석 시간이 훨씬 적게 소요되는 것으로 나타났고, P₄₄ 유전자를 이용하여 Real time PCR(Q-PCR)을 수행한 경우, 100%의 민감도를 나타냄을 확인함으로써 현재까지 아나플라즈마증 진단을 위해 개발되어 사용되고 있는 마커 및 검출용 프라이머에 비해 훨씬 높은 민감도 및 특이도를 보여, 보다 신속하고 정확하게 아나플라즈마증을 검출 및 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[81]

- [82] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 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 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] P_{44} 유전자를 함유하는 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 P_{44} 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 아나플라즈마병 진단 마커용 조성물.
- [청구항 3] P_{44} 유전자 또는 P_{44} 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 P_{44} 유전자의 수준을 측정하는 물질은 P_{44} 유전자 또는 P_{44} mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 프라이머는,
서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및
서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트
로 이루어진 군 중에서 선택되는 프라이머 세트이고,
상기 프로브는 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 프로브인 것을 특징으로 하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 P_{44} 단백질의 수준을 측정하는 물질은 P_{44} 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는, 아나플라즈마병 진단용 조성물.
- [청구항 7] 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및
서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트
로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는,
아나플라즈마 파고사이토피리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 검출용 프라이머 세트.
- [청구항 8] 서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는,

아나플라즈마 파고사이토피리움(*Anaplasma phagocytophilum*) 검출용 프로브.

[청구항 9] 제3항의 조성물을 포함하는 아나플라즈마병 진단 키트.

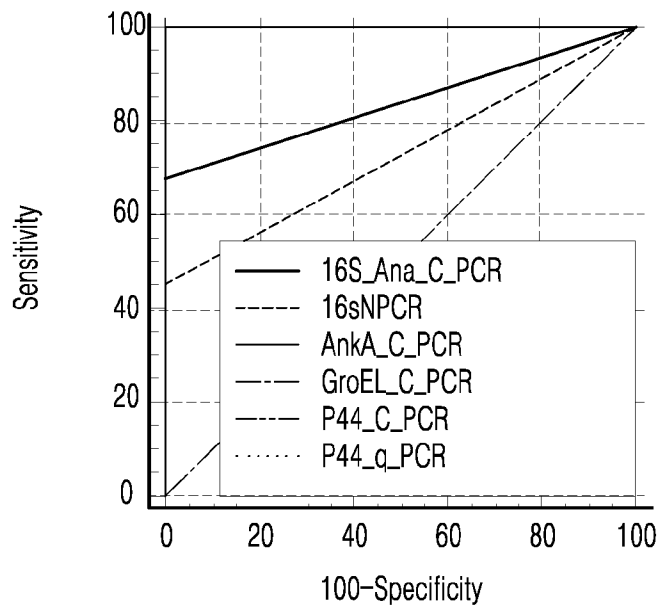
[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 진단 키트는,
서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트; 및
서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 프로브;
중에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는,
아나플라즈마병 진단 키트.

[청구항 11] 제3항의 조성물을 포함하는 아나플라즈마병 진단 키트를 사용하여
아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 5 및 6으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 7 및 8로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 10으로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 9 및 11로 이루어진 프라이머 세트;
서열번호 12 및 13으로 이루어진 프라이머 세트; 및
서열번호 14 및 15로 이루어진 프라이머 세트; 로 이루어진 군 중에서
선택되는 어느 하나의 프라이머 세트; 또는
서열번호 16 내지 서열번호 27로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느
하나의 프로브; 를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하는 것을
특징으로 하는, 아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를
제공하는 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 진단은 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 루프메개 등온증폭방법(LAMP:Loop-mediated Isothermal
Amplification)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는,
아나플라즈마증의 감염 여부를 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

[도 1]



Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
16S_Ana_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
16sNPCR	0.846	0.0666	0.660 to 0.954
AnkA_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
GroEL_C_PCR	0.731	0.0720	0.531 to 0.880
P44_C_PCR	0.846	0.0666	0.660 to 0.954
P44_q_PCR	1.000	0.000	0.877 to 1.000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/005252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/569(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 1/6883; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/569

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: anaplasmosis, P44, Anaplasma phagocytophilum, probe, primer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHASHI, N. et al. Human Granulocytic Anaplasmosis, Japan. Emerging Infectious Diseases. February 2013, vol. 19, no. 2, pages 289-292	1,3,4,6,9,11,13
Y	See pages 289, 290; tables 1, 2; and figure 2.	2,5,7,8,10,12
Y	NCBI. GenBank accession no. DQ011270.1 (24 March 2006)	2,5,7,8,10,12
	See the entire document.	
X	채준석. Anaplasma phagocytophilum 국내 야외 분리주 확보 및 현장검사용 진단키트 개발. 이공학 개인기초연구지원사업 최종보고서. 과학기술청 통부. 22 May 2017, pages 1-12 (CHAE, Junseok. Isolation of Anaplasma phagocytophilum Wild Strain and Development of Rapid Diagnostic Kits in Korea. Final Report for Individual Basic Research Support Project of Science and Engineering.)	1,3,4,6,9,11,13
	See pages 5, 6.	
X	LEE, S. H. et al. Diagnosis and molecular characteristics of human infections caused by Anaplasma phagocytophilum in South Korea. Journal of Microbiology. 2018, vol. 56, no. 11, pages 847-853	1,3,4,6,9,11,13
	See abstract; and page 848.	
X	KOEBEL, C. et al. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012, vol. 72, pages 214-218	1,3,4,6,9,11,13
	See page 215.	



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

27 JULY 2020 (27.07.2020)

Date of mailing of the international search report

27 JULY 2020 (27.07.2020)

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

International application No.

PCT/KR2020/005252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0086027 A (IDEXX LABORATORIES, INC.) 27 July 2011 See example 4.	1,3,4,6,9,11,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/005252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0086027 A	27/07/2011	BR P10920387 A2	28/01/2014
		CA 2739796 A1	15/04/2010
		CA 2739796 C	06/11/2018
		CA 3018728 A1	15/04/2010
		EP 2335070 A1	22/06/2011
		EP 2335070 B1	27/12/2017
		ES 2657221 T3	02/03/2018
		JP 2012-504964 A	01/03/2012
		JP 2016-020343 A	04/02/2016
		JP 2018-007664 A	18/01/2018
		JP 6110066 B2	05/04/2017
		JP 6333220 B2	30/05/2018
		JP 6688767 B2	28/04/2020
		MX 2011003634 A	02/05/2011
		TW 201018486 A	16/05/2010
		TW 1586365 B	11/06/2017
		US 2010-0086563 A1	08/04/2010
		US 2013-0064842 A1	14/03/2013
		US 2014-0050757 A1	20/02/2014
		US 2015-0323531 A1	12/11/2015
		US 8303959 B2	06/11/2012
		US 8580272 B2	12/11/2013
		US 9120857 B2	01/09/2015
		WO 2010-042691 A1	15/04/2010
		WO 2010-042691 A8	19/08/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/569(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/569

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: 아나플라즈마병(anaplasmosis), P44, 아나플라즈마 파고사이토피리움(Anaplasma phagocytophilum), 프로브(probe), 프라이머(primer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	OHASHI, N. 등, `Human Granulocytic Anaplasmosis, Japan`, Emerging Infectious Diseases, 2013.02., 19권, 2호, 페이지 289-292 페이지 289, 290; 표 1, 2; 및 도면 2	1,3,4,6,9,11,13
Y		2,5,7,8,10,12
Y	NCBI, GenBank accession no. DQ011270.1 (2006.03.24) 전체 문헌	2,5,7,8,10,12
X	채준석, `Anaplasma phagocytophilum 국내 야외 분리주 확보 및 현장검사용 진단키트 개발`, 이공학개인기초연구지원사업 최종보고서, 과학기술정보통신부, 2017.05.22, 페이지 1-12 페이지 5, 6	1,3,4,6,9,11,13
X	LEE, S. H. 등, `Diagnosis and molecular characteristics of human infections caused by Anaplasma phagocytophilum in South Korea`, Journal of Microbiology, 2018, 56권, 11호, 페이지 847-853 초록; 및 페이지 848	1,3,4,6,9,11,13
X	KOEBEL, C. 등, `Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis`, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 72권, 페이지 214-218 페이지 215	1,3,4,6,9,11,13

☒ 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 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

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 07월 27일 (27.07.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 07월 27일 (27.07.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0086027 A (아이텍스 레보러토리즈, 인코포레이티드) 2011.07.27 실시예 4	1,3,4,6,9,11,13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0086027 A	2011/07/27	BR PI0920387 A2	2014/01/28
		CA 2739796 A1	2010/04/15
		CA 2739796 C	2018/11/06
		CA 3018728 A1	2010/04/15
		EP 2335070 A1	2011/06/22
		EP 2335070 B1	2017/12/27
		ES 2657221 T3	2018/03/02
		JP 2012-504964 A	2012/03/01
		JP 2016-020343 A	2016/02/04
		JP 2018-007664 A	2018/01/18
		JP 6110066 B2	2017/04/05
		JP 6333220 B2	2018/05/30
		JP 6688767 B2	2020/04/28
		MX 2011003634 A	2011/05/02
		TW 201018486 A	2010/05/16
		TW I586365 B	2017/06/11
		US 2010-0086563 A1	2010/04/08
		US 2013-0064842 A1	2013/03/14
		US 2014-0050757 A1	2014/02/20
		US 2015-0323531 A1	2015/11/12
		US 8303959 B2	2012/11/06
		US 8580272 B2	2013/11/12
		US 9120857 B2	2015/09/01
		WO 2010-042691 A1	2010/04/15
		WO 2010-042691 A8	2010/08/19