



등록특허 10-2535489



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월22일

(11) 등록번호 10-2535489

(24) 등록일자 2023년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/04 (2017.01) C12Q 1/18 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류  
C12Q 1/04 (2013.01)  
C12Q 1/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7036073

(22) 출원일자(국제) 2015년06월12일

심사청구일자 2020년05월28일

(85) 번역문제출일자 2016년12월23일

(65) 공개번호 10-2017-0018346

(43) 공개일자 2017년02월17일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/063173

(87) 국제공개번호 WO 2015/189390

국제공개일자 2015년12월17일

(30) 우선권주장

1410585.2 2014년06월13일 영국(GB)

1507056.8 2015년04월24일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

US20060094034 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 최지다

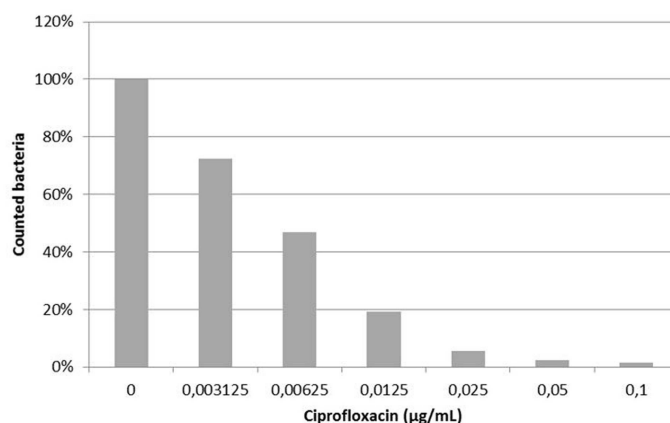
(54) 발명의 명칭 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법

(57) 요약

본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 a) 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계; b (i)) 선택적으로 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하는 단계; b (ii)) 선택적으로 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부를 채취하거나, 또

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



는 전배양 되었을 경우, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양된 임상 시료 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 그리고, 선택적으로 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 전배양하는 단계; c) 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 임상 시료 및/또는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양 또는 계속적으로 배양하는 단계; d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계; e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계; 상기 핵산 검사는 i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및 ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 사용하여 수행되며, 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 및/또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 연장되었는지(즉, 증폭 반응이 발생되었는지) 여부가 결정되는 것을 특징으로 하고, f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, 상기 배양된 임상 시료 및/또는 (c) 단계에서의 상기 일부에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계, 및 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하고, 선택적으로 상기 임상 시료 및/또는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 계속적으로 배양하는 단계; 또는 g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 및/또는 상기 일부를 더 배양하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 임상 시료에서 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다.

(52) CPC특허분류

*C12Q 1/689* (2018.05)

(56) 선행기술조사문헌

US20050095665 A1

US20120149599 A1

Diagn Microbiol Infect Dis 74(4):349-55.

PLoS ONE 7(2): e31068.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
  - b (i)) (a) 단계의 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물을 배양하지 않는 단계, 또는
  - b (ii)) 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하는 단계, 또는
  - b (iii)) 상기 첫 번째 배양용기로부터 (a) 단계의 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물 또는 (b)(ii) 단계의 전배양된 임상 시료 배양물의 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하는 단계, 또는
  - b (iv)) 상기 첫 번째 배양용기로부터 (a) 단계의 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물 또는 (b)(ii) 단계의 전배양된 임상 시료 배양물의 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 그리고, 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 전배양 하는 단계;
  - c) 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 또는 상기 일부를 배양 또는 계속적으로 배양하는 단계;
  - d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;
  - e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계로서, 상기 핵산 검사는:
    - i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물을 동정할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
    - ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 사용하여 수행되며,

상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 또는 상기 프라이머들이 연장되었는지 여부가 결정되는 것을 특징으로 하는, 단계; 및
  - f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, 상기 (c) 단계에서 배양된 임상 시료 또는 상기 일부에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계로,
- 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하는 단계; 또는
- g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 또는 상기 일부를 더 배양하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

- a) 배지가 함유된 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
- b) 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 배양하지 않거나 또는 전배양 하는 단계;

- c) 상기 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 배양 또는 계속 배양하는 단계;
- d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;
- e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계로서, 상기 핵산 검사는:
  - i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물을 동정할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
  - ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머를 사용하여 수행되며;
- 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 또는 상기 프라이머들이 연장되었는지 여부가 결정되는 것을 특징으로 하는, 단계; 및
- f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, (c) 단계에서 배양된 임상 시료에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계로서, 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하는 단계; 또는
- g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 더 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

- a) 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
- b (i)) 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하고, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양된 임상 시료의 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양하지 않거나 또는 전배양 하는 단계, 또는
- b (ii)) 상기 첫 번째 배양용기로부터 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 그리고, 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양하지 않거나 또는 전배양하는 단계;
- c) 상기 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양하거나 계속 배양하는 단계;
- d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;
- e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계로서, 상기 핵산 검사는:
  - i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물을 동정할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
  - ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 사용하여 수행되며;
- 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 또는 상

기 프라이머들이 연장되었는지 여부가 결정되는 것을 특징으로 하는, 단계; 및

f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, (c) 단계에서 배양된 일부에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계로서, 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하는, 단계; 또는

g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 또는 상기 일부를 더 배양 하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 (f) 단계는 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 또는 상기 일부를 계속적으로 배양하는 단계를 더 포함하는 것인, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물 성장은 시료 내에 존재하는 미생물 세포 물질의 양을 결정함으로써 평가되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 시료 내에 존재하는 미생물 세포 물질의 양은 미생물들, 미생물 집락들, 및 집합체들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 양, 수, 또는 크기를 측정함으로써 결정되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 시료 내에 존재하는 미생물 세포 물질의 양은 이미징(imaging)에 의해 결정되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 시료 내에 존재하는 미생물 세포 물질의 양은 이미징을 사용하여 미생물 생체량의 면적을 측정함으로써 결정되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 임상 시료는 패혈증에 걸리거나, 패혈증으로 의심되거나, 또는 패혈증에 걸릴 위험이 있는 피험자로부터 수득되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 임상 시료는 혈액 또는 혈액 분획물인 것을 특징으로 하는, 임

상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양용기는 혈액 배양 플라스크(flask)인 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 상기 임상 시료에 존재하는 어떤 항균제의 존재를 중화시키는 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미생물 DNA는 상기 검사용 부분 표본으로부터 선별적으로 분리 또는 농축되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (d) 단계 수행 이전 또는 (d) 단계 수행과 동시에 상기 검사용 부분 표본으로부터 또는 상기 검사용 부분 표본에서 미생물들을 분리 또는 농축하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 내지 (e) 단계들은 한번 이상 반복되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, (c) 내지 (e) 단계들은 초기 전배양 단계 없이 수행되고, (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, (c) 내지 (e) 단계들은 전배양 단계인 (b) 단계 후에 반복되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. (e) (i) 단계에서, 상기 탐침들 또는 프라이머들은 패혈증 유발 미생물들로 이루어진 패널(panel)에 속한 미생물의 동정을 위해 고안 또는 선별되거나,
- b. (e) (i) 또는 (ii) 단계에서, PCR 프라이머들이 사용되거나,
- c. (e) (i) 또는 (ii) 단계에서, 혼성화 탐침들이 사용되거나,
- d. (e) (i) 또는 (ii) 단계에서, 상기 혼성화 탐침들은 미생물을 식별할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열 또는 항균제 내성 표지에 해당 되는 뉴클레오타이드 서열과 혼성화할 수 있는 5' 및 3' 말단들을 포함하는 자물쇠(padlock) 탐침으로 사용되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (e) (i) 또는 (ii) 단계에서, 상기 탐침은 회전환 증폭(rolling circle amplification, RCA)에 의해서 검출되는 원형화된 자물쇠 탐침인 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 회전환 증폭은 회전환 증폭 산물이 단량체들로 분할되고, 상기 단량체들이 원형화되어 후속되는 회전환 증폭 반응을 위한 주형들로 사용되는 서클-투-서클 증폭(circle-to-circle amplification, C2CA) 이거나 또는 상기 서클-투-서클 증폭을 포함하거나,

- a. 상기 회전환 증폭 산물이 단량체들로 분할되고, 상기 단량체들이 어레이(array) 상에 혼성화된 후 상기 어레이 상에서 상기 단량체들이 검출되는 과정을 통해서 상기 회전환 증폭 산물이 검출되거나,
- b. 회전환 증폭 산물은 현미경 또는 이미징으로 또는 유동 세포 분석-유사 방법으로 검출되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (f) 단계에서의 미생물 성장은 직접적으로 미생물을 검출함으로써 결정되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 미생물은 염료로 표지화되어 검출되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (f) 단계에서의 미생물 성장은 간접적으로 미생물을 검출함으로써 결정되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 간접적인 미생물 검출은 자물쇠 탐침들을 사용하며, 미생물 게놈상의 뉴클레오타이드 서열과 혼성화하는 상기 자물쇠 탐침들은 원형화되어 회전환 증폭에 의해 증폭되고, 그 결과 얻어진 증폭된 연쇄체의 RCA 산물들을 검출 및 이들의 수를 계산함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 24

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (e) 단계의 핵산 검사를 위해서, 상기 분리된 DNA를 상기 DNA와 혼성화할 수 있는 포획 탐침들을 사용하여 고정화하는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

#### 청구항 25

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (e) 단계에서 단일의 미생물이 동정될 경우, (f) 단계가 수행되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

## 청구항 26

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (e) 단계에서 두 가지 이상의 미생물들이 동정될 경우, (g) 단계가 수행되는 것을 특징으로 하는, 임상 시료에서 미생물을 검출하고 특성을 규명하는 방법.

## 청구항 27

임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치로,

배지를 함유하고 임상 시료를 담을 수 있도록 배치된 배양용기;

검사용 부분 표본으로 사용되는 상기 배양용기의 내용물 일부를 채취하는데 사용되는 검사용 부분 표본 추출 장치로서; 여기서 상기 배양용기는 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 또는 상기 검사용 부분 표본의 추출 전에 상기 임상 시료를 배양하기 위한 것인, 검사용 부분 표본 추출 장치;

상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고, 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는데 사용되는 DNA 검사 장치;를 포함하고,

상기 DNA 검사 장치는 i. 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물을 동정할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및

ii. 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 이용하여 상기 핵산 검사를 수행하기 위해서 배치되고;

상기 DNA 검사 장치 사용을 통해서 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 또는 상기 프라이머들이 증폭 반응에 참여했는지 여부가 확인되는 것을 특징으로 하고; 그리고

상기 미생물 검출 장치는, 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정될 경우, 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 상기 배양용기에서 배양된 임상 시료는 항균제 감수성 검사 장치로 옮겨진 다음, 이에 대해서 성장 또는 성장에 대한 표지들을 평가하여 미생물 성장을 관찰하는 항균제 감수성 검사가 수행되고, 상기 항균제 감수성 검사에 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 상기 DNA 검사 장치에 의해 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되도록 배치되고; 그리고 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 이의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 추가 배양 후에 수행되는 추가의 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 더 배양하도록 배치되는 것;을 특징으로 하는 미생물 검출 장치.

## 청구항 28

임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치로,

배지를 함유하고 임상 시료를 담을 수 있도록 배치된 첫 번째 배양용기;

배지를 함유한 두 번째 배양용기; 및

첫 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하여 두 번째 배양용기로 옮기는 역할을 하는 일부분 제거 장치;를 포함하고,

상기 첫 번째 배양용기는 상기 임상 시료의 배양을 위한 것이고; 그리고

상기 두 번째 배양용기는 상기 첫 번째 배양용기의 내용물 일부로서 임상 시료와 배지로 이루어진 혼합물 또는



배양된 임상 시료를 받아들이 수 있도록, 그리고 상기 일부를 배양할 수 있도록 배치된 것;을 특징으로 하고,

상기 미생물 검출 장치는 검사용 부분 표본으로 사용되는 상기 두 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하는데 사용되는 검사용 부분 표본 추출 장치; 및

상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고, 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는데 사용되는 DNA 검사 장치;를 더 포함하고,

상기 DNA 검사 장치는 i. 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및

ii. 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 이용하여 상기 핵산 검사를 수행하기 위해서 배치되고; 그리고

상기 DNA 검사 장치 사용을 통해서 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화 되었는지 여부 또는 상기 프라이머들이 증폭 반응에 참여했는지 여부가 확인되는 것을 특징으로 하고; 그리고

상기 미생물 검출 장치는, 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정될 경우, 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 상기 두 번째 배양용기에서 배양된 일부는 항균제 감수성 검사 장치로 옮겨진 다음, 이에 대해서 성장 또는 성장에 대한 표지들을 평가하여 미생물 성장을 관찰하는 항균제 감수성 검사가 수행되고, 상기 항균제 감수성 검사에 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 상기 DNA 검사 장치에 의해 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되도록 배치되고;

그리고 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 이의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 추가 배양 후에 수행되는 추가의 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 또는 상기 배양된 일부를 더 배양 하도록 배치되는 것;을 특징으로 하는 미생물 검출 장치.

## 청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 장치는 제1항의 방법을 수행하기 위해 배치된 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치.

## 청구항 30

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 배양용기는 혈액 배양 플라스크인 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치.

## 청구항 31

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 배지는 상기 임상 시료에 존재하는 어떤 항균제의 존재를 중화시키는 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치.

## 청구항 32

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 DNA 검사 장치는 혼성화 탐침들을 이용하기 위해 배치된 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 혼성화 탐침들은 미생물을 식별할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열 또는 항균제 내성 표지에 해당 되는 뉴클레오타이드 서열과 혼성화할 수 있는 5' 및 3' 말단들을 포함하는 자물쇠 탐침들이고, 상기 DNA 검사 장치는 원형화된 상기 자물쇠 탐침을 회전환 증폭으로 검출하도록 배치된 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치.

### 청구항 34

삭제

### 청구항 35

삭제

### 청구항 36

삭제

### 청구항 37

삭제

### 청구항 38

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명이 제공하는 방법은 미생물 검출 및 특성 규명을 결합하여 수행할 수 있는 신속한 분자 검사 방법으로, 시료를 계속 배양하면서 본 발명의 방법을 사용할 수 있어, 한 번에 국한되지 않고 또 다른 검사에서도 시료를 사용할 수 있다.

## 배경 기술

[0002] 미생물에 의한 감염은 인간 및 동물 질병을 발생시킬 수 있는 주요한 경로로써 이로 인해 임상적 및 경제적으로 심각한 악영향을 초래한다. 다양한 종류 및 유형의 항균제들이 미생물 감염을 치료 및/또는 예방하기 위해 사용되면서, 현대 의학에서 항균제 내성이 큰 문제로 대두되고 있다. 지난 20년 동안 다양한 병원성 미생물들에서 항균제 내성 종들의 수는 증가되었고, 항균제 (특히, 항생제) 종류의 증가에 대응하여 미생물들도 이들 항균제에 대한 내성을 가지게끔 변화하고 있다. 항균제 내성 메카니즘이 전파되어 더 많은 생물체들에게서 항균제에 대한 내성이 발견되는 것과 더불어, 항균제 내성이 공중 보건에 미치는 영향과 이와 관련된 비용이 앞으로 급속히 증가될 것으로 예상된다. 미생물 감염 치료 측면에서 볼 때, 효과적인 치료를 보장하고 또한 불필요하거나 비효율적인 항생제 사용을 감소시켜서 항생제 내성 (더 일반적으로는 항균제 내성)이 확산되는 것을 제어하기 위해 감염 미생물의 특성과 이의 항균제 감수성 프로파일에 관한 정보를 얻는 것이 사실상 중요하고 또한 요구될 수 있다. 이는 특히 신속하고 효과적인 치료가 필수적인 심각하거나 생명을 위협하는 감염의 경우에 요구된다.

[0003] 심각한 감염에 의해 유발되는 잠재적으로 치명적인 전신 염증인 패혈증은 미국에서 가장 비용이 많이 드는 질환이고 병원 비용을 증가시키는 요인이기도 하며, 국가 전체 병원 비용에서 5%를 차지한다. 중증 패혈증의 경우 적절하게 치료 받지 않으면 매 시간 마다 7%씩 사망률이 증가하는데, 항균제 내성 패혈증의 유병률 증가를 초래하는 미생물 종들을 동정함으로써 점점 더 어려워지는 패혈증에 대한 정확한 치료 여부를 예측할 수 있다. 현재 패혈증을 유발하는 미생물들의 진단에 대한 최적 표준은 감염 미생물들의 분리와 이들에 대한 순수 배양이 요구되는 표현형 관찰 및 생화학적 동정 기술들에 기초한다. 감염을 확인하고 항균제 내성 미생물들의 감수성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정(microbial identification, ID) 및 항생제 감수성 검사(antibiotic susceptibility test, AST)는 며칠이 소요될 수 있다. 현재 임상 진료는 임상 증상을 기초로 하여 패혈증이 의심된 직후 1시간 이내에 광범위 항생제 처리가 요구되며, 두 번째 투여는 6에서 8시간 내에 행해

저야 하고 미생물의 동정 및 이들의 항생제 감수성이 밝혀질 때까지 매 6에서 8시간 마다 계속 투여된다.

- [0004] 패혈증의 치사 조건으로 인해, 미생물 감염의 특성이 결정되고 항균제 감수성이 밝혀질 때까지는, 그리고 환자가 광범위 항생제 치료에 임상적 반응을 보이는 한 의사들은 발병 초기에 행해지는 광범위 항생제 치료를 고수할 것이다. 이러한 치료는 광범위 항생제를 불필요하게 과다 사용하게 하며, 이로 인해 미생물들간에 항균제 내성의 증가를 촉진할 것이다.
- [0005] 종래의 검사법들은 미생물 성장 억제에 대한 항균제의 효과를 측정하기 위해 혼탁도 측정법 또는 디스크 확산 검사법(disc diffusion test)을, 그리고 미생물을 동정하기 위해 전통적인 생화학적 및 미생물학적 기술들을 이용한다. 이러한 기술들을 이용하여 임상 시료에서 미생물을 동정하고 이의 특성을 규명하기 위해서는 며칠이 소요될 수 있는데, 이는 미생물을 성장시키기 위해서 장기간 배양이 요구되기 때문이다. 그러므로, 미생물들을 신속하게 동정할 수 있고 항균제 내성 미생물들의 항균제 감수성 프로파일을 결정할 수 있는 기술들이 요구되며, 이에 따라 최근에는 시료 수집에서 진단까지 소요되는 시간을 단축시킬 수 있는 다양한 기술들이 개발되고 있다.
- [0006] 임상 시료에서 충분한 양의 미생물들을 확보할 수 있어 미생물들을 장기간 배양할 필요가 없는 방법이 미국특허 제8,481,265호에서 기술되는데, 세부적 내용에 의하면, 미생물을 제외한 세포들을 선택적으로 세포 용해함으로써 임상 시료들로부터 미생물 세포들을 충분히 확보할 수 있는, 즉, 시료에서 얻어지는 미생물 세포의 농도를 증가시켜서 시료 검사 전까지 장기간 배양이 필요하지 않는 방법이다.
- [0007] 미국특허 제2010/0124763호에 기술된 신속한 미생물 동정 방법으로서, 본 방법에 의하면 미생물 배양이 충분히 이루어지고 분광 분석으로 미생물들이 동정된다.
- [0008] 감수성 결정 전까지 미생물 배양 시간을 감소시키기 위해서 유동 세포 분석법(Broeren 외, 2013 Clin Microbiol Infect 19, 286-291 참조) 및 자동 현미경(Price 외, 2014 JMM. 98 50-59 참조)을 사용한 신속한 감수성 검사 기술들이 개발되었다. 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative PCR)을 이용하여 미생물 DNA 양을 정량하여 미생물의 성장을 측정하고, 그 결과를 바탕으로 항균제 감수성을 결정할 수 있는 방법이 개발되어 미국특허 제5,789,173호에 기술되었다.
- [0009] 또한, 미생물 동정 및 감수성 검사를 결합하여 수행할 수 있는 방법들이 개발되었다. 한 예로는 미국특허 제2005/0095665 A1호에 기술된 시스템을 들 수 있는데, 이 시스템에서는 선별된 성장 배지가 판으로 구분되는 미량정량 구멍(microtiter well) 평판을 사용하며 자동화 방식으로 미생물을 배양하면서 색소 및 형광 기질들을 사용하여 비탁 분석을 수행하여 미생물의 성장을 측정할 수 있으며, 이를 통해서 미생물들의 동정 및 항균제 감수성 결정을 동시에 할 수 있는 시스템이다. 또한, 자동 현미경 방법들도 개발되었다 (Metzger 외, 2014 Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 79 160-165 참조). 또한, BD Phoenix<sup>TM</sup> 시스템은 미생물 동정과 특성 규명을 동시에 그리고 신속하게 할 수 있게 해 주는데, 이 시스템을 통해 다양한 색소 및 형광 기질들을 사용하여 시료에서 미생물들을 동정할 수 있고, 또한 시료에서 미생물들의 미미한 성장을 확인함으로써 항균제 감수성을 결정할 수 있다.
- [0010] 미생물 동정을 위한 분자 생물학적 방법들이 개발 되었는데, 이들 방법들은 미생물들을 키워서 그 특성을 검사하기 보다는 미생물 세포 내부 또는 표면에 존재하는 핵산 또는 단백질 표지들을 검출하는 탐침들을 사용한다. 즉, 표지들의 검출을 통해서 미생물들을 동정할 수가 있다. 각각 다른 미생물들을 동정할 수 있는 이러한 분자 검사법들 상당수가 개발되었고, 사실상 특정 항균제들에 대한 내성 표지들과 연관된 다양한 유전적 변이체들 또는 유전적 특징들의 확인이 분자 검사법들을 통해서 이루어질 수 있었다.
- [0011] 하지만, 미생물들의 동정 및 특성 규명에 있어 상기 기술한 바와 같이 새로운 기술들의 개발에도 불구하고, 전문의들은 종래의 배양을 기초로 한 표현형 및 생화학적 방법들을 사용하지 않고 새로운 방법들만을 사용하는 것에 대해 신중한 입장이고, 또한 오늘날 많은 임상 연구실들에서는 이러한 종래의 방법들을 주요한 방법으로 사용하고 있다. 특히, 분자 검사에 관해서 볼 때, 이용 가능한 탐침들이 모든 가능한 잠재적 병원균들을 모두 검출할 수 없을 수도 있다는 인식, 즉, 분자 검사는 "완전성"이 결핍될 수도 있다는 인식으로 인해, 많은 전문의들은 이러한 새로운 검사에만 의존하기를 주저하고, 새로운 검사법들을 단지 보완적인 검사 방법으로 여긴다. 그러므로, 현재 감염성 질병들을 진단하는 임상적 시험에서는 종래의 전통적인 배양 방법들에 분자 검사 방법들을 추가적으로 실시하고 있다. 물론 이러한 전통적인 방법들도 완전성이 결핍되지만, 기존에 확립된 전통적인 방법들은 감염성 질병들을 진단하는 최적 표준으로 사용되고 있다.
- [0012] 따라서, 현재 임상적 시험은 분자적 및 전통적인 검사를 동시에 수행하기 위해서 환자로부터 이중으로 임상 시

료들을 채취하여야 한다. 이것은 시료들을 다루고 채취하는데 추가적 인원이 요구되는 바와 같이 수송 및 인적인 문제들을 초래할 수 있고, 환자에서 감염성 질병을 진단 및 치료하는데 있어 결코 있어서는 안될 지연을 초래할 수 있다. 또한, 임상 시료를 얻는 과정에서 오염될 위험이 높기 때문에 부가적인 허위 양성 진단을 내릴 위험성을 수반하게 된다. 또한, 분자 검사법을 통해서 발병 초기에 질병의 동정 및 진단을 할 수 있음에도 불구하고, 일부 경우들에서는 이러한 분자 검사법들이 중요하게 여겨지지 않을 수도 있다.

[0013] 본 발명은 상기 문제들을 고려하여 만들어졌고, 특히 동일한 임상 시료를 사용하여 분자적 및 전통적 검사법 모두를 수행할 수 있는 향상된 방법을 제공하고자 한다. 이에 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법을 제공하며, 상기 방법에 따르면 동일한 임상 시료를 사용하여 분자 검사 및 신속한 항균제 감수성 검사(antimicrobial susceptibility test, AST)와 더불어 전통적인 배양 방법들을 수행할 수 있고, 이를 통해서 이중으로 임상 시료를 채취할 필요성이 없는 것을 그 특징으로 한다. 상기 방법을 이용하면 분자 검사들이 수행되는 동안 시료가 배양되면서 미생물들을 성장시킬 수가 있는데, 만약 상기 분자 검사들을 통해서 미생물이 동정 되면, 전통적 또는 종래의 검사들이 수행될 필요가 없게 된다. 즉, 신속한 항균제 감수성 검사(antimicrobial susceptibility test, AST)와 결부된 분자적 미생물 동정(microbial identification, ID) 및 내성 검사로 충분하며, 이에 따라 종래의 또는 전통적인 배양-기반 검사들이 더 이상 필요하지 않게 된다. 본 발명의 방법을 사용하여 더 이상 배양이 필요가 없을지라도 검사에 사용된 시료는 계속해서 배양될 수 있고, 배양되는 시료는 상기 검사에 사용되거나 검사 결과에 대한 확인 또는 백업 등과 같은 목적을 위해 실시되는 추가적인 검사에 사용될 수 있다. 본 발명의 방법을 사용할 경우 종래의 방법들보다 더 빠른 진단이 가능하며, 불필요한 치료를 생략할 수 있을 뿐만 아니라 더욱 신속한 환자 치료를 가능하게 한다. 미생물 동정이 분자 검사만으로 충분하지 않을 경우, 종래의 검사법들을 동일한 시료에 적용시킬 수 있다. 이러한 우수한 방법은 아직까지 제대로 인식되거나 제안되지 않았다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 핵심적인 특징은 환자로부터 얻어진 단일 시료를 계속 배양하면서 본 발명에 따른 분자 검사 및 항균제 감수성 검사가 수행되는 것이다. 하지만, 오직 단일 배양일 필요는 없다. 단일의 초기 배양이 이루어질 수 있고(예를 들어, 단일 배양 기구에 임상 시료가 접종되어 준비되는 배양), 상기 초기 배양으로부터 하나 이상의 계대 배양이 이루어질 수 있으며, 그리고 초기 배양에 유래된 계대 배양은 본 발명에 따른 분자 검사 및 항균제 감수성 검사에 사용될 수 있다. 상기 초기 일차 배양은 더 필요되거나 요구되어질 수 있는 검사들에 대비해서 계속 배양될 수 있다.

[0015] 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 방법 및 특성 규명 방법을 제공하고, 특히 임상 시료에서 존재할 수 있는 미생물에 관한 것이며, 상기 방법은:

[0016] a) 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;

[0017] b (i)) 선택적으로 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하는 단계;

[0018] b (ii)) 선택적으로 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부를 채취하거나, 또는 전배양 되었을 경우, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양된 임상 시료 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 그리고, 선택적으로 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 전배양하는 단계;

[0019] c) 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 임상 시료 및/또는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양 또는 계속적으로 배양하는 단계;

[0020] d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;

[0021] e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계;

[0022] i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및

[0023] ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 사용하여 수행되는 것을 특징으로

하며;

- [0024] 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 및/또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 연장되었는지(즉, 증폭 반응이 발생되었는지) 여부가 결정되는 것을 특징으로 하고,
- [0025] f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, 상기 (c) 단계에서 배양된 임상 시료 및/또는 상기 일부에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계, 및
- [0026] 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하고,
- [0027] 선택적으로 상기 임상 시료 및/또는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 계속적으로 배양하는 단계; 또는
- [0028] g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 및/또는 상기 일부를 더 배양하는 단계를 포함한다.
- [0029] 본 발명의 방법은 임상 시료를 배양하여 본 발명의 방법에서 수행되는 종래의 배양 기반 동정 및 감수성 검사에 사용하면서도, 한편으로 동시에 상기 배양의 부분 표본들(또는 일부분들)을 채취하여 본 발명의 방법에서 첫 번째로 수행되는 분자 검사들 및 두 번째로 수행되는 신속한 항균제 감수성 검사에 사용하는데, 이는 종래의 검사들에서 필요로 하는 것을 생략할 수 있는 이점을 제공한다. 따라서, 본 발명의 방법은 동일한 임상 시료를 사용하여 종래의 검사들과 더불어 분자 검사들을 수행할 수 있다. 즉, 본 발명에 따르면 임상 시료를 배양하면서 분자 검사들((e) 단계), 및 선택적으로 (f) 단계의 항균제 감수성 검사가 수행될 수 있다. 상기 배양은 단일 배양(예를 들어, 임상 시료를 계속 배양하는 것)이거나 또는 첫 번째 또는 초기 배양이 계속 유지되면서(즉, 계속 배양하면서) 추가적인 배양이 이루어져서 검사를 위한 부분 표본을 제공하는데 사용될 수 있다. 사실상, (e) 단계 및 선택적으로 (f) 단계의 분자 검사들을 수행하는 동안 시료 또는 시료의 일부를 계속적으로 배양함으로써, (e) 및 (f) 단계의 분자 검사 및 항균제 감수성 검사와 더불어 추가적인(예를 들어, 종래의) 검사들을 위해 요구되는 배양이 효과적으로 수행된다. 따라서, 본 발명의 방법의 (f) 단계는 일부 구체예들에서는 (c) 단계에서 배양된 임상 시료 또는 배양의 일부분에서 얻어진 추가의 부분 표본에 대한 항균제 감수성 검사를 수행하는 것으로 나타낼 수 있다. 적어도 부정적 또는 결정적이지 못한 결과가 분자 검사들로부터 얻어지기 전까지는 단일 배양 시스템을 사용하여, 단일로 이루어지는 초기 배양(즉, 첫 번째 배양)을 설정하고 유지하는 것이 검사를 단순하고 편리하게 진행되도록 할 것이다. 하지만, 일부 경우들에서는 융통성 있게 다른 배양 시스템들을 사용하는 것이 요구될 수도 있는데, 이는 초기 첫 번째 배양의 계대 배양(즉, 두 번째 배양)을 설정함으로써 이루어질 수 있다. 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이, 예를 들어, 일단 두 번째 배양이 설정되면, 첫 번째 배양은 다른 배양 시스템(예를 들어, 종래의 배양 캐비넷)으로 이동될 수 있고, 상기 두 번째 배양은 본 발명의 분자 검사 및 신속한 항균제 감수성 검사를 위해 배양 전용 시스템(예를 들어, 기구)에서 배양될 수 있거나, 또는 더 구체적으로는 유지 또는 계속될 수 있다.
- [0030] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명의 방법은:
- [0031] a) 배지가 함유된 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
- [0032] b) 선택적으로 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양 하는 단계;
- [0033] c) 상기 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 배양 또는 계속 배양하는 단계;
- [0034] d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;
- [0035] e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계;
- [0036] 상기 핵산 검사는 i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 종재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
- [0037] ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성



표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머를 사용하여 수행되며,

- [0038] 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 및/또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 연장되었는지(즉, 증폭 반응이 발생되었는지) 여부가 결정되는 것을 특징으로 하고,
- [0039] f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, (c) 단계에서 배양된 임상 시료에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계, 및
- [0040] 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하며,
- [0041] 선택적으로 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 계속적으로 배양하는 단계; 또는
- [0042] g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 더 배양하는 단계;를 포함한다.
- [0043] 상기에 기술된 바와 같이, 추가적인 양태에서는 추가의 배양이 임상 시료로부터 설정될 것이다. 일 구체예에서는, 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료가 투입되고, 곧 바로 또는 상기 첫 번째 배양용기의 내용물 일부(예를 들어, 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부 또는 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료의 배양물 일부)가 선택적으로 전배양된 후에 채취되어 두 번째 배양용기로 접종되는데 사용될 것이다. 상기 및 하기에 기술되는 바와 같이, 전용 기구 또는 장치는 본 발명의 방법을 수행하기 위해 제공될 것이고, 요구되거나 필요시 종래의 검사법들을 수행하기 위해 종래의 배양 시스템 또는 기구(예를 들어, BECTON DICKINSON 또는 Bioré의 배양 캐비닛)와 함께 사용될 것이다. 상기 전용 기구 및 장치는 상기 임상 시료를 포함한 상기 첫 번째 배양용기를 수용하고, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양물 일부를 채취하여 상기 두 번째 배양용기로 상기 일부를 투입할 수 있도록 제작될 수 있다. 따라서, 상기 임상 시료 및 상기 배지를 함유한 상기 첫 번째 배양용기(예를 들어, 혈액 배양 플라스크)는 종래의 방법을 통해 수행되는 검사를 위해서 추가의 배양 시스템(예를 들어, 배양기)에 둘 수 있고, 한편으로 상기 첫 번째 배양용기로부터 얻은 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부 또는 상기 임상 시료 배양물의 일부가 배양(선택적인 전배양 포함) 및 항균제 감수성 및 미생물 동정 검사를 위해 본 발명의 장치에서 유지될 수 있다.
- [0044] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은:
- [0045] a) 배지가 함유된 첫 번째 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
- [0046] b (i)) 선택적으로 상기 첫 번째 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하는 단계;
- [0047] b (ii)) 상기 임상 시료와 상기 배지로 이루어진 혼합물의 일부를 채취하거나, 또는 전배양 되었을 경우, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양된 임상 시료 일부를 채취하여, 배지가 함유된 두 번째 배양용기에 상기 일부를 투입하고, 그리고, 선택적으로 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 전배양하는 단계;
- [0048] c) 상기 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하고, 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 배양하거나 계속 배양하는 단계;
- [0049] d) 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하는 단계;
- [0050] e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계;
- [0051] 상기 핵산 검사는 i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 종에 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
- [0052] ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 사용하여 수행되며;
- [0053] 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 및/또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또

는 상기 프라이머들이 연장되었는지(즉, 증폭 반응이 발생되었는지) 여부가 결정되는 것을 특징으로 하고,

[0054] f) (e) 단계에서 미생물이 동정될 경우, (c) 단계에서 배양된 일부에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 단계; 및

[0055] 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장은 성장을 측정하거나 또는 성장에 대한 표지들을 측정함으로써 관찰되고, 상기 항균제 감수성 검사에서 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 (e) 단계에서 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되는 것을 특징으로 하며,

[0056] 선택적으로는 상기 두 번째 배양용기에서 상기 일부를 계속적으로 배양하는 단계; 또는

[0057] g) (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 동정된 미생물의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 추가적으로 할 수 있도록 상기 임상 시료 및/또는 상기 일부를 더 배양 하는 단계;를 포함한다.

[0058] 본 발명의 어느 구체예들에서, (e) 단계에서 얻어지는 동정 결과의 긍정성 여부와 무관하게 종래의 방법 또는 다른 방법을 사용하여 미생물 동정 및/또는 항균제 감수성 검사가 배양된 시료 또는 배양물 일부에 대해서 추가로 수행될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 방법은 상기 임상 시료 또는 배양물 일부의 배양을 가능하게 함으로써, 추가적인 동정 및/또는 항균제 감수성 검사가 수행될 수 있게 하는데, 예를 들자면, 이를 통해 추가적인 결과(예를 들어, 백업 또는 확인을 위한 결과)를 얻을 수 있다. 추가의 구체예에서는, 추가의(예를 들어, 종래의) 검사들이 (e) 단계의 미생물 동정 검사 및/또는 (f) 단계의 항균제 감수성 검사로부터 얻어지는 결과의 긍정성 여부에 따라서 수행될 수 있다. 바람직한 양태에서는, 상기 임상 시료(즉, 상기 첫 번째 배양용기의 임상 시료)는 수행될 추가의 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 계속 배양된다.

[0059] (e) 및/또는 (f) 단계들의 상기 검사들은 반복 또는 한 번 이상 수행될 수 있다. 즉, (f) 단계의 상기 핵산 검사를 한 번 이상(예를 들어, 두 번 이상, 예를 들어, 2 또는 3회) 수행하기 위해 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양으로부터 한 번 이상 부분 표본들이 (예를 들어, 간격을 두고) 채취될 수 있다. 선택적으로, 또한, 요구될 경우, (f) 단계의 항균제 감수성 검사는 한 번 이상 수행될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, (f) 단계의 항균제 감수성 검사가 진행되는 동안 및 또한 선택적으로 상기 검사가 완료된 후에 상기 배양 용기에서 상기 임상 시료는 계속 배양될 수 있다. 그러므로, 상기 항균제 감수성 검사가 반복되거나 또는 종래의 검사를 위해 상기 배양이 계속 될 수 있다. 본 발명에서 기술된 바와 같이, 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 및 상기 배지로 이루어진 혼합물의 부분 표본 또는 상기 혼합물에서 채취된 배양물 일부는 단순히 일부분, 즉, 상기 배양용기 내용물의 한 부분 또는 일부이다. 상기 부분 표본은 (e) 단계의 핵산 검사를 위해 채취되고 직접적으로 사용될 수 있거나(즉, (d) 단계에서 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리한 후에), 또는 (f) 단계의 항균제 감수성 검사에서 사용될 수 있거나, 또는 (d)/(e) 단계 및/또는 (f) 단계의 상기 검사들을 수행하기 전 배양될 수도 있다. 또한, 상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기로부터 채취된 검사용 부분 표본은 하위(sub)-부분 표본들 또는 부분 표본 일부들로 분할 시켜 나눌 수 있거나, 하위-부분 표본들 또는 일부는 상기 검사용 부분 표본으로부터 채취되어 검사 또는 추가 배양에 사용될 수 있다. 채취된 상기 검사용 부분 표본 또는 상기 부분 표본 일부는 상기 배양용기에서 배양 또는 계속 배양되는 상기 임상 시료와는 별도로 또는 독립적으로 배양될 수 있다.

[0060] 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 배양하거나 또는 상기 첫 번째 배양용기로부터 채취된 상기 일부분을 배양하는 단계, 또는 상기 검사용 부분 표본 및 상기 부분 표본 일부를 배양하는 단계는 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이 어느 편리한 또는 바라는 방식대로 수행될 수 있다. 이것과 관련하여, 예를 들어, 진단 또는 미생물 검출 목적을 위해 임상 시료들의 배양에 필요한 알려진 배양 기구가 사용될 수 있다. 상기 배양용기(예를 들어, 상기 첫 번째 및 두 번째 배양용기)의 분리 배양을 위해 및/또는 어느 채취된 검사용 부분 표본들 및 부분 표본 일부들의 분리 배양을 위해 및/또는 상기 항균제 감수성 검사 동안 요구되는 배양을 위해 다른 배양 기구 또는 배양 시스템들이 사용될 수 있다. 또한, 상기 및 하기에 기술되는 바와 같이, 본 발명에 따르면 본 명세서에 기술된 바와 같이 미생물 검출 방법 및 특정 규명 방법을 수행하기 위한 기구 또는 장치를 제공할 것으로 예상된다. 이러한 장치 또는 시스템은 상기 배양용기를 배양하기 위한 기구 또는 수단을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에 의하면, 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서의 배양 및 계속 배양, 검사용 부분 표본(예를 들어, 상기 첫 번째 검사용 부분 표본)을 채취하기 전에 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서의 선택적인 전배양, 및 상기 검사용 부분 표본 또는 상기 부분 표본 일부를 배양하는 단계들, 또는 (f) 단계의 항균제 감수성 검사 동안 수행되는 배양은 동일 또는 다른 배양 시스템들 또는 배양 기구에서 수행될 수 있다. 예를 들어, (e) 단계의 동정 검사로부터 음성 결과가 나올 경우, 상기 배양용기는 다른 배양 시스템 및 기구로 옮겨질

수 있다. 배양 기구에 옮겨지기 전에 상기 배양용기(예를 들어, 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기)의 표면은 세척되거나 오염물질이 제거될 수 있다 (예를 들어, 상기 임상 시료 또는 상기 배양물 일부가 상기 배양용기로 투입된 후에).

[0061] 그러므로, 일 구체예에서 상기 선택적인 전배양 및 상기 검사 단계들이 수행되면서 상기 배양용기(예를 들어, 상기 첫 번째 배양용기)는 하나의 시스템에서 배양될 수 있다. (e) 단계의 동정 검사들이 음성이거나 및/또는 결론에 이르지 못한 것일 경우, 또는 (f) 단계의 항균제 감수성 검사가 음성이거나, 결론에 이르지 못한 것일 경우 또는 불완전한 경우, 상기 배양용기는 추가적인 또는 분리된 배양 시스템으로 옮겨져서, 예를 들어, 종래의 동정 검사들 및/또는 항균제 감수성 검사를 수행하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 추가적인 또는 분리된 배양 시스템은 종래의 배양 캐비닛, 또는 더 자동화된 미생물 검사 및 검출 시스템(예를 들어, 진단 시스템)일 수 있다.

[0062] 대표적인 예로써, 본 발명의 방법의 일 구체예에서, 검사 대상인 피험자로부터 얻은 임상 시료는 배양용기(이 경우 상기 첫 번째 배양용기로 간주될 수 있음)로 투입된다 ((a) 단계에 해당됨). 어느 배양이 이루어지기 전에, 검사용 부분 표본은 채취되어 ((c) 단계에 해당됨), (d) 및 (e) 단계들에서 사용된다. 이때 상기 배양용기의 임상 시료는 배양된다. (e) 단계의 동정 검사에서 양성 결과가 얻어질 경우, 추가의 부분 표본은 상기 배양용기로부터 채취되고 (f) 단계의 항균제 감수성 검사에서 사용된다. (e) 단계에서의 동정 검사에서 음성 결과가 얻어질 경우, 상기 임상 시료를 포함한 상기 배양용기는, 예를 들어, 분리된 시스템에서, 추가 배양된다.

[0063] 두 번째 일 구체예에서, 상기 방법은 상기 기술된 바와 같이 수행되는데, 단, (c) 단계에서 검사용 부분 표본을 제거하기 전에 전배양 단계를 포함한다.

[0064] 세 번째 일 구체예에서, 검사용 부분 표본은 배양용기로부터 채취되고 (상기 (c) 단계에 해당), 상기 부분 표본의 일부는 (d) 및 (e) 단계들(핵산 분리 및 검출 단계)에 적용되어 사용된다. 상기 배양용기로부터 상기 검사용 부분 표본이 채취되어 상기 과정이 이루어지는 동안 추가의 부분 표본 일부 또는 상기 검사용 부분 표본의 나머지는 배양된다. 상기 분리된 부분 표본 및 상기 부분 표본 일부 및 상기 배양용기의 배양은 동일하거나 다른 시스템에서 이루어질 수 있다. (e) 단계의 동정 검사에서 양성 결과가 얻어질 경우, 상기 배양된 추가의 부분 표본 일부 및 남아있는 부분 표본은 (f) 단계의 항균제 감수성 검사에 사용된다. (e) 단계에서의 동정 검사에서 음성 결과가 얻어질 경우, 상기 임상 시료를 포함한 상기 배양용기는, 예를 들어, 분리된 시스템에서, 추가적으로 배양된다.

[0065] 네 번째 일 구체예에서, 상기 첫 번째 배양용기로부터 배양물 일부가 채취되고 (전배양 기간 전 또는 후에) 배지가 함유된 두 번째 배양용기로 투입된다. 상기 두 번째 배양용기로부터 검사용 부분 표본이 채취되고 ((c) 단계에 해당됨), (d) 및 (e) 단계들에 적용되어 사용된다. 상기 과정동안 상기 두 번째 배양용기의 배양물은 배양된다. (e) 단계의 동정 검사에서 양성 결과가 얻어질 경우, 추가의 부분 표본이 상기 두 번째 배양용기로부터 채취되고 (f) 단계의 항균제 감수성 검사에 사용된다. (e) 단계에서의 동정 검사에서 음성 결과가 얻어질 경우, 상기 동일한 부분 표본을 함유한 상기 두번째 배양용기는 더 배양된다. 추가의 일 구체예에서, 상기 첫 번째 배양용기는, 예를 들어, 분리된 시스템에서, 추가적 또는 대신해서 더 배양될 수 있다.

[0066] 추가의 일 구체예에서, 상기 기술된 첫 번째, 두 번째, 세 번째 및/또는 네 번째 대표적 구체예들은 e) 단계에서 양성 또는 음성 동정 결과가 얻어지는 것에 상관없이 상기 임상 시료를 포함한 상기 배양용기를 계속 배양하는 것을 포함할 수 있다. 이런식으로 추가적인 결과가 상기 시료로부터 얻어질 수 있다.

[0067] 일부 바람직한 구체예들에서, 분자 검사(즉, (e) 단계의 핵산 검사)는 임상 시료를 배양하지 않고 이루어진다. 오늘날 행해지는 많은 미생물 검사 절차들에서, 동정 검사들은 (종래의 생화학적 검사들에 의한 것이든 또는 분자 검사들에 의한 것이든 간에) 미생물 배양에서 양성 결과가 나올 경우, 즉, 미생물 성장이 검출 될 경우 (배양 검사가 양성일 경우), 가능하다. 따라서, 예를 들자면, 혈액 또는 다른 시료는 배양용기(예를 들어, 혈액 배양 플라스크)에 투입되어, 그리고 배양된다. 미생물 성장의 발생 여부를 지시 및 검출하기 위해서, 예를 들어, 미생물 성장에 따라 변화되는 신호를 나타내는 지표 기질을 사용하거나 (예를 들어, pH 변화, 기질의 전환 및 소모, 또는 미생물 대사 산물 등의 발생에 기인하여 변화된 신호를 보이는 지표 기질) 또는 단순히 미생물 성장을 검출하는 어느 수단을 사용하는 배양 시스템이 설계되거나 또는 그러한 기능을 가지는 배양 시스템이 선택되고 사용된다. 미생물의 성장이 검출할 수 있을 만큼 충분히 발생되어 성장 신호를 획득하는 경우, 이는 배양 및 미생물 검출에서 "양성" 결과를 지시한다 (즉, 비록 이 시기에 미생물의 종류는 밝혀지지 않는 않지만, 임상 시료에 미생물의 성장이 일어나고 있음을 지시함). 이 단계에서 동정 및/또는 항균제 감수성 검사들이 일반적으로 수행된다. 상기 미생물 성장 검사는 얼마간의 시간(예를 들어, 6, 8, 10 또는 12 시간 또는 그 이상)이 소요된



다.

[0068] 본 발명은 이러한 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어질 때까지 기다릴 필요가 없는 장점을 가지는데, 이는 미생물 동정이 더 신속하게 이루어질 수 있음을 지시한다. 본 발명의 (b) 단계에서는 분자 검사 전에 선택적인 전배양을 할 수 있다. 이는 배양 검사에서 양성의 결과를 얻는데 필요한 기간 보다 짧을 수 있다. 따라서, 대표적인 일 구체예에서, (d) 및 (e) 단계들은 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어지기 전에 이루어진다. 추가의 일 구체예에서, 본 발명의 (d) 및 (e) 단계들은 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어지기 전에 먼저 수행되고 (또는 배양 검사에서 양성의 결과를 얻기 위해 요구되는 시간 전에) 그리고, 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어진 후에 (또는 양성의 결과를 얻기 위해 요구되는 시간 후에) 반복될 수 있다. 다시 말해, 바람직한 일 구체예에서, 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어지기 이전에, 또는 특히 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어지는데 요구되는 시간 이전에, (e) 단계에서 적어도 한 세트 이상의 핵산 검사가 수행될 수 있다. 추가의 대표적인 일 구체예에서, (f) 단계(항균제 감수성 검사 단계)는 배양 검사에서 양성의 결과가 얻어지거나 얻어질 수 있기 전에 또한 수행될 수 있다. 하지만, 본 발명의 방법에 따르면, 배양 검사에서 양성의 결과를 얻은 후에 (e) 및 (f) 검사 단계들을 수행하는 것을 배제하지 않고, 다른 예를 들면, 배양 검사에서 양성의 결과를 얻은 후에 (c) 단계에서 검사용 부분 표본을 채취하는 것을 배제하지 않는다. 이러한 경우에는, (b) 단계의 전배양은 배양 검사에서 양성의 결과를 얻을 때까지 또는 배양 검사에서 양성의 결과를 얻어지는데 예상되는 시간까지 상기 배양용기를 배양하는 것과 연관될 수 있다.

[0069] (e) 단계의 핵산 검사에 관한 바람직한 일 구체예에서 미생물의 존재 여부 확인용 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화하는 첫 번째 세트의 핵산 탐침들 및 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화하는 두 번째 세트의 핵산 탐침들이 사용된다. 상기 구체예에서, 혼성화된 탐침의 검출은 탐침의 증폭과 연관되거나 탐침의 증폭에 의해 이루어질 수 있다. 따라서, 혼성화된 탐침의 검출은 증폭된 탐침을 검출함으로써 수행될 수 있다. 따라서, (e) 단계에 해당되는 본 발명의 방법은 상기 탐침에 대한 하나 이상의 증폭 프라이머들을 사용하는 것을 포함하는데, 즉, 탐침의 표적이 되는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 탐침의 증폭에 필요한 프라이머들이 제작되거나 또는 선별된다. 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이, 일부 바람직한 구체예들에서는, 상기 탐침이 이의 표적인 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 경우, 상기 탐침은 결찰될 수 있도록 제작될 수 있으며, 예를 들어, 결찰 반응으로 상기 탐침을 원형화될 수 있다. 따라서, 탐침의 결찰은 상기 표적 뉴클레오타이드 서열이 존재함을 지시하는 것이다. 결찰된(예를 들어, 원형화된) 탐침의 검출은 상기 결찰된 탐침의 증폭에 의해 이루어질 수 있는데, 예를 들자면, 상기 결찰된 탐침을 주형으로 사용하여 증폭 산물을 발생시키고 (예를 들어, 원형화된 탐침은 회전환 증폭(rolling circle amplification, RCA) 반응을 위한 주형이 될 수 있음), 그리고 상기 증폭된 산물을 직접적으로 또는 상기 증폭된 산물에 혼성화하는 검출 탐침을 사용하여 검출함으로써 결찰된 탐침의 검출이 이루어질 수 있다.

[0070] 하기에 더 기술되는 바와 같이, (f) 단계의 항균제 감수성 검사는 어느 편리한 또는 요구되는 방식대로 수행될 수 있다. 따라서, 미생물 성장은 다른 항균제들(예를 들어, 항생제들)의 존재하에서 및/또는 항균제(예를 들어, 항생제)의 다른 양 또는 농도하에서 평가(또는 결정)될 수 있다. 미생물의 성장은 직접적으로 또는 성장에 대한 표지들을 평가(또는 결정)함으로써 평가될 수 있다.

[0071] 따라서, 미생물의 성장은 시료에 존재하는 미생물 세포 물질(즉, 미생물 생체량)의 양을 결정함으로써 평가될 수 있는데, 특히, 이는 직접적인 평가 또는 결정을 통해서 이루어질 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 미생물 성장의 평가는 시각적으로 미생물 생체량의 양을 결정하여, 특히 이미징에 의해서 이루어질 수 있다. 특히, 이차원 이미지들이 획득되고 평가될 수 있다. 따라서, 바람직한 일 구체예에서, 미생물 생체량의 면적(더 구체적으로는, 조사되는 영역의 시야에서, 예를 들어, 하나의 이미지에서, 미생물 생체량의 면적)은 결정될 수 있다.

[0072] 미생물 성장은 시료에 존재하는 미생물 세포 물질(즉, 미생물 생체량)의 양을 결정함으로써 평가될 수 있으며 (여기서, 특히, 상기 항균제 감수성 검사를 위해 준비된 검사용 미생물 배양에서), 특히, 이는 직접적인 평가 또는 결정을 통해서 이루어질 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 미생물 성장 평가는 시각적으로 미생물 생체량을 결정함으로써, 특히 이미징에 의해서, 이루어진다. 특히, 광축에 수직으로 배열된 (여기서, xy-배열된으로 일컬어지는) 이차원 이미지들이 얻어지고 평가될 수 있다. 상기 시료의 특정 영역은 단일의 xy-배열된 이미지에 포함되며, 상기 이미지의 크기는 이미징 기구의 광학적 특성에 의존한다. xy-공간에서 각각의 위치에 대해, 하나 이상의 이차원 이미지들이 광축 또는 z 축을 따라 다른 간격으로 수집될 수 있다. 따라서, 연속된 또는 포개진 이차원 이미지들이 발생되어, 상기 시료 용량에 대한 삼차원 정보를 제공할 수 있다. 시료로부터 삼차원 정보를 추출하는 대안 방법으로는 UNISENSOR(예를 들어, 미국특허 제8780181호 참고)에서 사용되는 방법을 들 수 있는데, 이 기기에서는 광축이 xy-평면에 대해 기울어지고, 시료 또는 검출기가 x 또는 y 평면을 따라

움직인다. 여기서, xy 공간에 추가하여, z 공간으로 연장된 연속된 이미지들이 요구된다. 또한, 상기 방법에서 이어지는 이미지 데이터의 변화를 통해서, 이차원 이미지들을 xy 평면에 수직으로 배열하여 포개지도록 할 수 있다.

[0073] 상기 포개진 이차원 이미지들에 내재하는 삼차원 정보가 일단 추출되면, 상기 삼차원 정보는 상기 분석 시료에서의 전체 세포 질량을 추산/추론/추정하는데 활용될 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 이차원 이미지들은 예를 들어 하나의 이차원 이미지로 z-스택(stack)들의 투사에 의해 삼차원 정보로부터 만들어질 수 있다. 그 다음, 결과로 얻어진 상기 이차원 이미지를 사용하여 분석이 수행될 수 있다. 그 다음, 미생물 생체량의 면적은 조사되는 영역의 시야에서, 예를 들어, 투사된 이차원 이미지에서, 미생물 생체량을 지시하는 광학 밀도의 면적으로 결정될 수 있다. 이러한 방법은 상기 기술분야에서 일반적인 방법이고 민감도를 증가시킬 것이며, 그리고 명시 야상 이미지들에 대한 상기 방법의 알고리즘들은 공개적으로 이용가능한 CELLPROFILER 소프트웨어(MIT, 미국)에서 찾을 수 있다. 형광 이미지들에 대해서 유사한 분석이 행해질 수 있고, 이에 대한 많은 대안적인 알고리즘들이 예를 들어 CELLPROFILER 및 대부분의 상업성 이미지 분석 시스템들에 있다.

[0074] 또 다른 구체예에서, xy 공간에서 각각의 위치에 걸친 z 공간에서 강도 변화는 기록되는데, 이는 특정 위치에서 미생물 덩어리를 지시한다. 전체 xy 공간에 걸쳐 강도 변화를 통합하여 전체 미생물 용량을 측정할 수 있다. 또한, 이러한 절차에 대한 알고리즘들은 일반적으로 이용 가능한 이미지 분석 소프트웨어(예를 들어, 프리웨어 CELLPROFILER)에 있다.

[0075] 더 일반적으로는, 미생물 성장은 미생물들 및/또는 미생물 집락들 또는 집합체들의 양 및/또는 수 및/또는 크기를 결정함으로써 평가될 수 있다. 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이, 일부 바람직한 구체예들에서, 미생물의 성장은 이미징에 의해서, 또는 다르게 표현하면, 미생물들의 시각화에 의해서 평가(결정)된다. 따라서, 세포들의 집합체 또는 무리들(클러스터들), 또는 미생물 집락들과 같은 형태로 성장하는 미생물 세포들은 시각화 또는 이미지화되어 이들의 성장이 결정(또는 평가 또는 추적 관찰)될 것이다. 이와 같이 미생물 성장을 평가하는 것은 세포들 또는 집락들을 세는 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않고 미생물 세포들, 집락들 또는 집합체들의 크기, 면적, 모양, 형태 및/또는 수를 결정(또는 평가)함으로써 미생물 성장 정도를 시각적으로 평가하는 어느 수단들을 포함한다 (여기서 용어 "집합체"는 물리적으로 근접한 세포들의 어느 무리(예를 들어, 무리 또는 클러스터)를 포함하며, 이것은 클론(clonal) 집락들 뿐만 아니라 뭉쳐지거나 서로 들러붙는 세포들의 비-클론(non-clonal) 무리들 및 클러스터들을 포함할 수 있다 (예를 들어, 뭉쳐져서 집합체를 이룬 인접한 세포들)). 미생물 성장 측정에 사용되는 매개변수는, 변환 필요는 없지만, (e) 단계에서 동정된 미생물의 종류 및 (f) 단계에서 사용되는 항균제들에 따라서 변환 수 있다. 일반적으로, 유기체 및 사용된 항균제들에 따라서, 세포들의 형태 또는 성장 패턴이 영향받을 수 있고, 그리고, 예를 들어, 항균제가 없을 때 보여지는 "정상" 또는 "전형적" 형태 또는 성장 패턴이 항균제로 인해 변화 또는 바뀔 수 있다. 일부 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장을 추적 관찰하는 방법들은 상기 변화를 검출하는 것에 의존적일 수 있지만, 본 발명에 따르면 상기 변화를 고려하는 것은 필수적이지 않으며 미생물 성장의 정도(예를 들어, 면적) 또는 생체량은 미생물들의 형태 및/또는 성장 패턴과 무관하게 결정될 수 있다. 따라서, 상기 성장 관찰 방법은 미생물 세포 및/또는 사용된 항균제들에 관계없이 사용될 수 있다. 상기 항균제 감수성 검사를 수행하기 위한 방법들은 하기에 더 기술된다.

[0076] 유리하게는, (e) 단계에서 양성 결과를 얻은 후에 임상 시료(예를 들어, 검사용 부분 표본)는 항균제 감수성 검사에 직접적으로 사용될 수 있다. 임상 시료/일부/검사용 부분 표본/부분 표본 일부 등은 (d) 및 (e) 단계들이 수행되는 시간 동안 배양될 것이고, (f) 단계 전에 어느 추가의 계대 배양이 수행될 필요는 없다. 사실상, 유리한 구체예들에서, 추가의 계대 배양 단계가 없다. 특히, 추가의 배지 또는 배양용기에서 계대 배양 단계가 없다. 특히, 항균제 감수성 검사 전에 미생물의 순수 배양을 얻기 위해 계대 배양하는 단계가 없다. 이는 더 신속한 항생제 감수성 검사가 수행될 수 있다는 것을 지시한다.

[0077] 유리하게는, 신속한 항균제 감수성 검사가 수행된다. 따라서, 바람직한 일 구체예에서, (f) 단계의 항균제 감수성 검사에서는 6, 7, 또는 8 시간 이내에, 예를 들면, 4 또는 5 시간 이내에, 결과를 얻을 수 있다.

[0078] 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물 성장의 관찰 또는 평가는 계속 성장을 관찰하거나 또는 일정 기간에 걸쳐 (예를 들어, 5, 6, 7 또는 8 시간까지) 간격을 두고 성장을 관찰함으로써 이루어지거나, 또는 상기 항균제 감수성 검사를 위해 배양이 최초 시작되는 시점에서의 성장과 상기 배양의 후속 시간 시점(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 또는 8 시간까지)에서의 성장을 비교함으로써, 또는 실질적으로는 두 개 이상의 다른 시점들에서 성장을 비교함으로써 수행될 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 미생물 성장은 하나 이상의 시점들에서, 즉, 적어도 두 개의 시점들에서 결정된다.

- [0079] 본 발명의 방법은 어느 미생물의 검출 및 특성 규명을 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 임상적으로 연관된 미생물들에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미생물"은 미생물의 범주 내에 속하는 모든 유기체를 포함한다. 반드시 그렇지만은 않지만, 상기 미생물들은 단세포성이거나, 또는 단세포성 라이프 스테이지(life stage)를 가질 수 있다. 상기 미생물은 원핵 또는 진핵 세포일 수 있고, 일반적으로 세균, 고세균, 균류, 조류, 및 원생생물(특히, 원생동물 포함)을 포함한다. 그람 양성 또는 그람 음성 또는 그람 비결정적(gram-indeterminate) 또는 그람 무반응(gram-non-responsive)일 수 있는 세균, 및 균류가 특히 관심 대상이다.
- [0080] 특히, 임상적으로 연관된 세균 속들은 *스타필로코커스*(응고효소 음성 *스타필로코커스* 포함), *클로스트리듐*, *에세리키아*, *살모넬라*, *슈도모나스*, *프로피오니박테륨*, *바실루스*, *락토바실루스*, *레지오넬라*, *미코박테리움*, *마이코코커스*, *푸소박테륨*, *모락셀라*, *프로테우스*, *에세리키아*, *클렙시엘라*, *아시네토박터*, *부르크홀데리아*, *엔테로코커스*, *엔테로박터*, *시트로박터*, *헤모필루스*, *나이세리아*, *셀라티아*, *스트렙토코커스*(알파 용혈성 및 베타 용혈성 *스트렙토코키* 포함), *박테로이데스*, *여시니아*, 및 *스테노트로포모나스* 및 어느 다른 창자세균 또는 대장균형 세균을 포함한다. 베타 용혈성 *스트렙토코키*는 A, B, C, D, E, F, G 및 H 군 *스트렙토코키*를 포함한다.
- [0081] 그람 양성 세균의 비제한적 예들로는 *스타필로코커스 아우레우스*, *스타필로코커스 헤몰리티쿠스*, *스타필로코커스 에피더미디스*, *스타필로코커스 사프로피티쿠스*, *스타필로코커스 루그두넨시스*, *스타필로코커스 스크레이페리*, *스타필로코커스 카프레*, *스타필로코커스 뉴모니에*, *스타필로코커스 아갈락티에*, *스타필로코커스 피오게네스*, *스타필로코커스 살리마리우스*, *스타필로코커스 생귀니스*, *스타필로코커스 안지노수스*, *스트렙토코커스 뉴모니에*, *스트렙토코커스 피오게네스*, *스트렙토코커스 미티스*, *스트렙토코커스 아갈락티에*, *스트렙토코커스 안지노수스*, *스트렙토코커스 에쿠이누스*, *스트렙토코커스 보비스*, *클로스트리듐 퍼프린젠스*, *엔테로코커스 패칼리스*, 및 *엔테로코커스 패숨*을 포함한다. 그람 음성 세균의 비제한적 예들로는 *에세리키아 콜라이*, *살모넬라 본고리*, *살모넬라 엔테리카*, *시트로박터 코세리*, *시트로박터 프룬디*, *클렙시엘라 뉴모니에*, *클렙시엘라 옥시토카*, *슈도모나스 에루지노사*, *헤모필루스 인플루엔자*, *나이세리아 메닝지티디스*, *엔테로박터 클로아케*, *엔테로박터 애로진스*, *셀라티아 마르체센스*, *스테노트로포모나스 말토필리아*, *모르가넬라 모르가니*, *박테로이데스 프라질리스*, *아시네토박터 바우마니* 및 *프로테우스 미라빌리스*를 포함한다.
- [0082] 임상적으로 연관된 균류는 효모균류, 특히 *칸디다* 속, 및 *아스페르길루스*, *푸사리움*, *페니실리움*, *뉴모시스티스*, *크립토코커스*, *코시디오데스*, *말라세지아*, *트리코스포론*, *아크레모늄*, *리조푸스*, *무코르* 및 *옵시디아* 속들의 균류를 포함할 수 있다. *칸디다* 및 *아스페르길루스*가 특별한 관심의 대상이다. 균류의 비제한적 예들로는 *아스페르길루스 피마가터스*, *칸디다 알비칸스*, *칸디다 트로피칼리스*, *칸디다 글라브라타*, *칸디다 두블리니엔시스*, *칸디다 파라프실로시스*, 및 *칸디다 크루세이*를 포함한다.
- [0083] 용어 "검출"은 광범위하게 미생물의 존재 유무를 결정하는 어느 수단을 가리킨다. 따라서, 상기 검출은 어떤 식으로든 미생물이 존재하는지를 결정, 평가 또는 측정하는 것을 포함할 수 있으며, 이는 질적, 정량적 또는 반정량적 결정들을 포함할 수 있다.
- [0084] 용어 "특성 규명"은 광범위하게 미생물의 고유 특성 및/또는 특징에 관한 정보를 결정하는 어느 수단을 지시하며, 특히 미생물을 동정하는 것을 포함한다. 특히, 미생물은 적어도 미생물이 속한 속이 동정될 것이고, 바람직하게는 미생물의 종이 동정될 것이다. 일부 경우에는 심지어 군주 수준까지 동정이 가능할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법을 사용함으로써 미생물이 특정 항균제들에 민감한지 여부 또는 민감할 것으로 예상되는지 여부를 결정할 수 있거나, 또는 미생물이 어떤 항균제에 저항성을 가지는지 여부 또는 저항성을 가질것으로 예상되는지 여부를 결정할 수 있으며, 예를 들어, 미생물이 가지는 항균제 감수성 프로파일을 결정할 수 있다. 이는 분자 내성 표지들이 존재하는지를 검사함으로써 행해질 수 있는데, 여기서 분자 내성 표지들은 항균제 종류들과 연관되거나 또는 항균제들에 내성을 보이는 유전적 변이체들 또는 특정 유전적 서열들일 수 있다. 물론, 상기 분자 검사들을 통해 미생물이 항균제에 민감한지를 확정적으로 결론 내릴 수가 없으며, 항균제에 대한 민감성 여부는 미생물의 성장에 대한 항균제의 영향이 직접적으로 검사되는 (f) 단계의 항균제 감수성 검사에서 판단된다.
- [0085] 용어 "용해"는 세포가 파괴되는 것을 지시한다. 특히, 세포가 파괴되면서 세포 내용물(특히, 핵산 포함)을 유출하게 된다. 상기 용해는 당 기술분야에서 잘 알려진 많은 방법들에 의해 이루어질 수 있는데, 예를 들면, 세포를 분해하여 부분적으로 또는 완전히 세포 내 구성성분들을 주변 용액으로 유출시킬 수 있는 바이러스 또는 효소를 이용한 메카니즘, 기계적, 전기적 또는 화학적 메카니즘, 또는 열, 냉각 또는 삼투성을 이용한 메카니즘에 의해 용해가 이루어질 수 있다.
- [0086] 상기 임상 시료는 검사받는 검사 대상으로부터 얻을 수 있는 어느 임상 시료일 수 있으며, 이때 검사 대상은 일반적으로 환자일 것이나 어느 인간 또는 동물(일반적으로 포유류)도 그 대상이 될 수 있다. 따라서, 상기 임상



시료는 신체 조직, 세포 또는 체액일 수 있거나, 또는 신체로부터 유래되는 어느 시료(예를 들어, 면봉으로 채취한 시료, 세척시 얻어지는 시료, 흡입물, 또는 시료가 포함된 세척액 등)일 수 있다. 적합한 임상 시료들로는 혈액, 혈청, 혈장, 혈액 분획물, 관절 체액, 오줌, 정액, 침, 배설물, 대노척수 체액, 위 내용물, 질 분비물, 점액, 조직 생검 시료, 조직 분쇄액, 골수 흡입물, 뼈 분쇄액, 가래, 흡입물, 상처 삼출물, 면봉로 채취한 시료 및 면봉으로 세척 후 남은 시료, 예를 들어, 코인두를 면봉으로 세척 후 면봉에 남은 시료 및 다른 신체 체액들을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 임상 시료는 혈액 또는 혈액 유래 시료, 예를 들어, 혈청, 혈장 또는 혈액 분획물이다.

[0087] 상기 미생물은 어느 미생물, 특히 어느 병원성 미생물 또는 신체에서 감염을 일으키는 어느 미생물일 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 검사 대상인 피험자의 신체 어느 부분에서 미생물 감염(즉, 어느 미생물 감염)을 검출 또는 진단하기 위해서 사용될 수 있고, 이에 따라, 상기 임상 시료의 고유 특성은 예를 들어, 감염 또는 감염이 의심되는 증상의 나타남 또는 피험자의 일반적 임상 조건에 따라 결정 될 수 있다. 비록 모든 미생물 감염을 포함하지만, 본 발명의 방법은 특히 패혈증 또는 의심되는 패혈증의 검출 또는 진단에 활용될 수 있다. 따라서, 상기 임상 시료는 패혈증을 가지거나, 패혈증을 가진 것으로 의심이 되거나, 또는 패혈증에 걸리 위험이 있는 피험자로부터 얻어질 수 있다. 이러한 경우, 상기 시료는 일반적으로 혈액 또는 혈액 유래 시료일 것이다. 전형적으로 상기 시료는 혈액일 것이다.

[0088] 본 발명의 방법의 상기 첫 번째 단계((a) 단계)에서 상기 시료는 배지를 함유하고 있는 배양용기로 투입된다. 이는 표준 단계로서, 당 기술 분야에서 잘 알려지고 문헌에 폭넓게 기술된 표준 절차들에 따라 수행된다.

[0089] 상기 배양용기는 미생물 세포들의 배양에 적합한 어느 용기를 포함할 수 있는데, 예를 들어, 평판, 배양 구멍을 갖춘 용기, 튜브, 병, 플라스크 등이 있다. 편의성을 위해, 시료가 혈액 또는 혈액 유래 시료일 경우, 상기 배양용기는 혈액 배양 플라스크이며, 그 예로는 BacT/ALERT 혈액 배양 플라스크(BIOMERIEUX), BACTEC 혈액 배양 플라스크(BECTON DICKINSON) 또는 VersaTREK 혈액 배양 플라스크(THERMO FISHER)일 수 있거나, 또는 혈액 시료 채취에 사용되는 (특히 미생물 검출을 위한 배양 목적으로 사용되는) 어느 튜브, 플라스크 또는 병일 수 있다.

[0090] 편의성을 위해, 상기 배양용기는 배지가 이미 함유된 상태로 제공될 수 있다. 하지만, 상기 배지는 상기 배양용기와 분리되어 제공되어, 상기 임상 시료 첨가 전후에 배양용기로 투입되거나 또는 상기 시료를 배양용기에 첨가할 때 동시에 투입될 수 있다.

[0091] 상기 배지는 어느 적합한 배지일 수 있고, 임상 시료의 고유 특성 및/또는 의심되는 미생물, 및/또는 피험자의 임상 조건 등에 따라서 선택될 수 있다. 상기에 해당되는 많은 다른 미생물 배지가 알려져있다. 당 기술분야에서 알려진 바와 같이, 일반적으로 상기 배지는 미생물의 빠른 성장을 촉진하는 충분한 영양분을 함유하고 있다. 많은 경우 당 기술 분야에서 알려진 바와 같이, 적절한 배지는 복합적인 증식 배지로서 증식 목적의 일반적인 성분 뿐만 아니라 트립틱 소이 액체 배지(tryptic soy broth), 콜롬비아 액체 배지(Columbia broth), 뇌-심근 침출 액체 배지(brain heart infusion broth), 브루셀라 액체 배지(Brucella broth)를 포함하고, 특정 성장 인자들 또는 보충물들을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 배지는 액체, 고체, 현탁액 등 다양한 형태일 수 있고, 이들 중 어느 형태든 사용될 수 있으나, 편리하게는 상기 배지는 액체 배지일 것이다. 상술된 바와 같이, 상기 배양용기로 혈액 배양 플라스크가 사용될 경우, 상기 플라스크는 다양한 미생물들을 성장시킬 수 있도록 특별히 변형된 특성화된 배지를 포함할 것이다. 일반적으로 제조자에 의해 혈액 배양 플라스크에 공급되는 배지는 검사 대상으로부터 채취한 임상 시료에 존재하는 어느 항생제들의 영향을 중화시킬 수 있는 물질 또는 첨가제를 포함할 것이다. 상기 중화 물질들을 포함하거나 또는 포함하지 않는 플라스크들이 사용될 수 있고, 요구될 시 상기 배양용기에 중화 물질들이 추가될 수 있다.

[0092] 상기 기술된 바와 같이, (e) 단계의 동정 검사를 위한 첫 번째 검사용 부분 표본은 상기 시료가 상기 배양용기(상기 첫 번째 또는 두 번째 배양용기일 수 있음)에 있는 상기 배지와 접촉한 후 (예를 들어, 상기 시료 및 배지를 혼합한 후에) 즉시 또는 실질적으로 즉시 채취될 것이다. 이는 예를 들어 상기 시료를 상기 배양용기에 투입 후 10, 15, 20 또는 30 분 이내에 수행될 수 있거나, 또는 임상적 상황에 따라서 더 긴 시간이 걸릴 수 있으며, 예를 들어, 1, 2 또는 3 시간 이내에 수행될 수 있다.

[0093] (b) 단계는 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 전배양하는 선택적인 단계이며 (또는 상기 첫 번째 배양용기로부터 얻은 배양물 일부를 상기 두 번째 배양용기로 투입하여 배양하는 단계이며), 이 단계에서는 상기 분자 검사가 실시되기 전에 상기 시료에 존재하는 어느 미생물들의 성장(즉, 증식)이 이루어진다. 상기 단계의 수행 여부는 상기 시료의 고유 특성, 의심되는 감염, 피험자의 임상적 상태 등에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 시료가 오줌일 경우, 상당수의 미생물 세포들이 시료에 있을 것으로 예상되기 때문에 전배양 단계가 요구되지 않을

것이다. 하지만, 예를 들어, 혈액 시료인 경우, 시료에 존재하는 세포의 수는 일반적으로 적을 것으로 예상되고, 이에 따라 전배양 단계를 통해서 미생물 세포들의 수를 증가시킴으로써 분자 검사에 충분한 수의 세포들을 제공할 수 있거나, 또는 미생물에서 DNA 등을 회수하는 효율을 높일 수 있다. 또한, 상기 단계의 실시 여부는 상기 미생물 동정 및 내성 표지 검출에 사용되는 분자 검사들(즉, 탐침들)의 고유 특성 및 상기 핵산 검사의 민감성 및/또는 특이성에 따라 결정될 것이다.

[0094] 일반적으로 전배양은 미생물 성장에 도움이 되거나 적합한 조건하에서 상기 배양용기를 배양하는 것과 연관되며, 예를 들어, 특정한 온도(예를 들어, 20에서 40 °C 사이의 온도, 또는 25에서 40 °C 사이, 예를 들어, 25에서 37 °C 사이의 온도, 또는 30에서 35 °C 사이의 온도)에서 전배양이 수행될 수 있다. 배양용기, 배지, 의 심되는 미생물, 임상적 조건 등의 고유한 특성에 따라 상기 배양용기는 교반, 회전 또는 요동등과 같은 배양 조건에서 배양될 수 있다.

[0095] 전배양은 어느 적합한 또는 요구되는 기간 동안 수행될 수 있으나, 본 발명의 방법을 신속히 수행하기 위해 바람직하게는 6 또는 8 시간 이내의 짧은 기간 동안 수행될 것이다. 예를 들어, 전배양은 검사 시작 전에, 또는 특히 (c) 단계에서 검사용 부분 표본의 채취 이전에, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 시간까지의 시간 동안 수행될 수 있다. 대안적으로, 전배양은 1시간 이내의 시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 전배양은 6 시간 이상, 예를 들어, 7, 8 또는 9 시간 동안, 또는 9시간 이상, 예를 들어 10 시간 까지, 또는 12 시간 동안, 또는 더 긴 시간 동안 수행될 수 있으나, 신속한 방법을 제공하기 위해 일반적으로 전배양은 최소한으로 유지되고, 6 시간까지의 짧은 전배양 기간, 또는 특히 3 또는 4 시간까지의 전배양 기간이 바람직하다. 상기 기술된 바와 같이, 전배양은 양성 결과를 얻기 위해 필요로 되는 기간보다 짧은 기간동안 수행되거나 또는 양성 결과를 얻기 전까지 수행될 수 있다.

[0096] (c) 단계의 검사용 부분 표본의 채취는 상기 배양용기의 고유 특성 및 상기 배양용기가 어떤 식으로 배양되는지에 따라, 어느 편리한 수단을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 혈액 배양 플라스크의 경우, 부분 표본은 바늘 및 주사기를 사용하여 간단하게 추출될 수 있다. 정상적인 임상적 및 미생물학적 실험법에 따르면, 상기 단계는 오염을 피하거나 또는 제거하면서, 예를 들어, 무균 조건에서, 수행될 수 있다. 예를 들어, 바람직하게는 부분 표본을 채취하기 전에, 및/또는 부분 표본을 채취한 후에 혈액 배양 플라스크와 같은 배양용기의 격막은 깨끗하게 청소되거나 오염물질의 제거가 이루어질 것이다.

[0097] 편이를 위한 일 구체예에서는, 상기 검사용 부분 표본의 채취를 위한 상기 수단(예를 들어, 상기 바늘, 및 선택적으로 상기 주사기)은 단일-사용 형태, 즉 소모품으로 제공될 것이다. 즉, 상기 수단은 일회용이고 재사용되지 않을 것이다.

[0098] 배양을 계속 유지하면서 검사용 부분 표본을 채취하는 (c) 단계는 한번 이상 수행될 것이다. 실제로, (e) 단계의 분자 검사들 및 (f) 단계의 항균제 감수성 검사를 수행하기 위해서, 대개 두 개의 분리된 부분 표본들이 취해질 것이고 각각 계속적으로 배양될 것이다. 하지만, 상기 언급한 바와 같이, 상기 분자 검사들을 수행하기 위해 채취된 부분 표본의 일부는 유지 및 배양될 것이다. 상기 일부는 반복되는 상기 분자 검사들을 위해 사용되거나 (예를 들어, 두 번째 시점에서) 및/또는 상기 항균제 감수성 검사에 사용될 것이다. 하지만, 반복되는 상기 분자 검사들을 위한 분리된 부분 표본들은, 예를 들어, 시간 간격을 두고, 또한 채취될 것이다. 따라서, (e) 단계의 분자 검사는 한 번 이상 수행될 것이다. 일 구체예에서는, (b) 단계의 전배양 전에 수행되는 초기 분자 검사를 위해 (a) 단계 후에 곧바로 부분 표본이 채취될 것이다. 상기 초기 분자 검사가 음성이거나 또는 완전한 결론을 내리기 힘든 경우, 예를 들어, 두 번째 부분 표본이 두 번째 분자 검사를 수행하기 위해 전배양 기간 후에 채취될 것이다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 하기 단계들을 포함할 수 있다:

- [0099] i) 배지가 함유된 배양용기에 임상 시료를 투입하는 단계;
- [0100] ii) 상기 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 채취하는 단계;
- [0101] iii) 상기 (e) 단계에서 기술된 바와 같이, 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고 핵산 검사들을 수행하는 단계;
- [0102] iv) (iii) 단계가 진행되는 동안, 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 배양하는 단계;
- [0103] v) 상기 배양용기로부터 검사용 부분 표본을 추가로 채취하고, 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 계속 배양하는 단계;
- [0104] vi) 상기 (e) 단계에서 기술된 바와 같이, 상기 추가로 얻은 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고 핵산 검

사를 수행하는 단계;

- [0105] 이러한 두 번째(또는 어느 더 추가되는) 분자 검사가 음성일 경우, 상기 방법은 (g) 단계로 진행될 것이다. 따라서, 상기 배양용기의 배양은 수행될 추가 검사들을 위해 계속 유지될 것이다.
- [0106] (e) 단계의 분자 핵산 검사를 수행하기 위해서, 상기 채취된 부분 표본 또는 상기 부분 표본 일부로부터 DNA가 분리된다 ((d) 단계에 해당). 미생물 DNA는 상기 분자 검사들을 수행하기 위해 요구되고, 상기 임상 시료의 고유 특성에 따라 검사 대상인 상기 피험자로부터 상당수의 세포들이 있을 수 있는데, 이는 상기 DNA분리 검사 또는 이어지는 검사과정을 복잡하게 하거나 방해가 될 수 있다. 특히, 상기 임상 시료에서 검사 대상인 상기 피험자의 세포에 존재하는 DNA, 즉, 미생물 이외의 세포로부터 유래되는 DNA(예를 들어, 인간 DNA)는 미생물 DNA의 검출 및 검사를 어렵게 할 수 있는데, 특히 미생물 세포 수보다 혈액 세포(특히 백혈구) 수가 훨씬 더 많은 혈액 시료와 같은 경우를 그 예로 들 수 있다. 따라서, 상기 검사용 부분 표본으로부터 미생물 DNA를 선별적으로 분리 또는 농축하는 것이 바람직할 것이다. 본 발명의 방법은 상기 검사용 부분 표본에서 또는 상기 검사용 부분 표본으로부터 미생물 또는 미생물 세포를 분리 또는 농축하는 단계를 선택적으로 포함하며, 예를 들어, 상기 단계는 DNA 또는 미생물 DNA를 분리하는 단계 이전 또는 동시에 수행된다.
- [0107] 상기 시료에서 미생물을 농축하는 적합한 방법들로는 상기 부분 표본에 존재하는 미생물 이외의 모든 세포들을 용해하는 것, 또는 상기 부분 표본으로부터 미생물 세포들을 선별적으로 분리하는 것 (즉, 상기 부분 표본으로부터 미생물 세포들의 양성 또는 음성 선택)을 포함할 수 있다. 이러한 방식들은 당 기술 분야에서 알려져 있다. 예를 들자면, 미생물의 종류와 무관하게 행해질 수 있는 방법으로 시료에서 미생물을 선별적으로 농축하기 위한 미생물 이외의 세포들을 선별적으로 용해하는 방법은 미국 특허 제2013/0171615호, 제2012/0231446호, 제2010/0184210호, 제7893251호 및 제8481265호에 기술되고, 시료로부터 진핵 세포들을 선별적으로 제거하는 방법은 미국 특허 제2005/0202487호에 기술된다.
- [0108] DNA를 분리하는 방법들은 당 기술 분야에서 알려져 있고, 알려지거나 기술된 다양하고 다른 방법들 중 어느 방법들이 사용될 수 있다. 일반적으로 이러한 방법들은 다양한 수단 및 방식으로 행해질 수 있는 세포 용해와 방출된 DNA를 회수하는 것과 관련이 되고, 이를 위한 다양한 수단 및 절차는 알려져 있고 이용 가능하며 이들 중 어느 수단 및 절차가 사용될 수 있다. 비록 많은 절차들은 미생물들을 대개 용해시킬 수 있지만, 상기 세포 용해 단계는 의심되는 미생물의 고유 특성에 의존적일 수 있다.
- [0109] 상기 언급한 바와 같이, 상기 시료의 고유 특성에 의존하여, 바람직하게는 상기 단계는 미생물 DNA를 분리하는 것, 특히 선별적으로 미생물 DNA를 분리 또는 농축하는 것과 연관된다. 이는 일반적으로 상기 시료에서 미생물 세포는 보존하면서, 검사 대상인 피험자의 세포를 선별적으로 용해함으로써 수행될 수 있다. 상기 단계를 수행할 수 있는 많은 절차들 및 키트들이 알려져 있고 구할 수 있는데, 그 예로 MOLZYM(독일)을 들 수 있다. 예를 들어, 상기 부분 표본에 존재하는 미생물 세포를 용해하지 않으면서 인간 세포(예를 들어, 인간 혈액 세포)를 쉽게 용해할 수 있다. 시료에 의존하면서, 시료 속에 존재할 수 있는 다른 인간 또는 포유류 세포들에 대해서도 동일한 방법이 적용된다. 혈액 또는 혈액 유래 시료의 경우에 미생물 DNA의 분리 또는 특히 선별적인 분리는 바람직하다.
- [0110] 따라서, 검사받는 피험자로부터 유래된 상기 임상 시료에 있는 어느 세포들 및 상기 검사용 부분 표본에 있는 어느 세포들은 미생물 세포들을 용해시키지는 않는 세포 용해 조건에서 용해될 것이다. 예를 들어, 적합한 세포 용해 물질(예를 들어, 세포 용해 완충용액)은 상기 검사용 부분 표본에 첨가될 것이다. 첫 번째 세포 용해 단계에서 방출된 DNA 또는 더 일반적으로는 핵산은 제거될 수 있는데, 이는 예를 들어 DNA 분해 효소(예를 들어, DNase)를 사용하는 분해를 통해서 이루어지거나, 및/또는 예를 들어, 여과, 칼럼 분리, 침전, 원심 분리 등과 같은 분리 방법을 사용하여 상기 시료로부터 DNA 또는 핵산을 분리 또는 제거하거나, 및/또는 용해되지 않은 어느 미생물 세포들을 분리할 수 있는 어느 방법들을 통해서 수행될 수 있으며, 단 일 구체예를 따르면 원심 분리를 포함하지 않는 방법이 바람직하다. 따라서, 일 구체예에서, DNA 분리 단계는 원심 분리를 포함하지 않고, 더 바람직한 구체예에서는, 상기 방법 전체에서 원심 분리를 포함하지 않는다. 상기 단계들에 사용되는 어느 효소들(특히 DNA 분해 효소들)은 비활성화 또는 제거될 수 있는데, 이는 예를 들어 가열 또는 단백질 분해 효소를 추가함으로써 이루어질 수 있다.
- [0111] 다음으로, 상기 처리된 부분 표본(예를 들어, 상기 첫 번째 세포 용해 단계로부터 얻은 용해물)에서 남은 미생물 세포들은 세포 용해 조건하에서 용해되는데, 예를 들어, 적당한 세포 용해 물질(예를 들어, 세포 용해 완충용액)을 첨가함으로써 미생물 세포들의 세포 용해를 유발한다. 많은 이러한 완충용액은 당 기술분야에서 알려져 있고, (예를 들어, MOLZYM(독일)에서) 구입이 가능하다. 상기 두 번째 미생물 세포 용해 단계에서 방출된 미생

물 DNA는 회수될 수 있는데, 예를 들어, 상기 반응 혼합물(용해물)로부터 분리될 수 있다. 상기와 같이, 이에 대한 많은 기술들은 이용가능하고 이들 기술들 중 어느 기술들은 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 단계는 원심 분리를 포함하지 않는다.

[0112] 상기 회수된 DNA 또는 미생물 DNA는 다음으로 (e) 단계의 분자 검사들에 사용된다. (e) 단계의 분자 핵산 검사를 수행하기 전에, 상기 검사용 부분 표본으로부터 분리 또는 농축된 이중 가닥 DNA(특히 미생물 DNA)를 변성시키는 것이 요구된다. 더욱이, (e) 단계의 분자 검사들을 수행하기 전에 상기 DNA를 단편화시키는 것이 도움이 되거나 요구될 수 있다 (하지만 필수적이지는 않다). 상기 단계들은 당 기술 분야에서 알려진 일반적으로 수행되는 방법들로서, 예를 들어, 단편화는 가열 또는 효소(예를 들어, 제한 효소 또는 다른 핵산내부가수분해효소)에 의한 분해에 의해 이루어질 수 있다.

[0113] 근본적으로, 상기 분자 검사들에서는 핵산 탐침들 또는 프라이머들이 사용되는데, 이들은 특정 미생물 핵산 서열에 혼성화하거나 특정 미생물 핵산 서열을 선택적으로 증폭할 수 있도록 제작되는데, 이들이 핵산 서열과 혼성화되었을 경우 연장 되도록(예를 들어, 성공적으로 증폭 반응이 일어날 수 있도록) 제작되어진 것을 특징으로 하고, 이들을 사용하여 특정 미생물의 존재 여부를 검출하고, 상기 미생물이 유전적 항균제 내성 표지를 가지고 있는지 여부를 검출할 수 있다. 상기 핵산 검사 및 상기 핵산 검사에서 사용되는 상기 혼성화 탐침들 또는 상기 프라이머들은 당 기술 분야에서 알려져 있고 문헌에 기술된다.

[0114] 혼성화 탐침은 요구되거나 선별된 표적 서열(바람직하게는, 특이적으로 혼성화되는 표적 서열)에 혼성화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 것이다. 따라서, 상기 혼성화 탐침은 표적 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 탐침이 비표적 뉴클레오타이드 서열들의 존재하에서 표적 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으면 절대적 또는 100% 상보성이 요구되지는 않는다. 혼성화를 검출함으로써, 표적 서열의 존재 여부를 검출할 수 있고, 핵산 탐침의 혼성화를 검출하기 위해 다른 방식들을 사용하는 많은 혼성화 분석시험 구성방식들을 알려져 있고 사용될 수 있다. 일반적으로, (e) 단계의 검출은 상기 혼성화 탐침을 검출함으로써 수행될 수 있다.

[0115] 상기 기술된 바와 같이, 상기 혼성화 탐침의 검출은 상기 혼성화 탐침을 증폭하는 것을 포함하거나 또는 이와 관련될 수 있다. 따라서, 혼성화 탐침들에 더하여, 상기 혼성화 탐침들을 위한 하나 이상의 증폭 프라이머들이 제공될 수 있다.

[0116] 본 발명의 방법의 경우, (e)(i) 단계에서 상기 표적 서열은 우선적으로 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열이며, 즉, 상기 서열은 특정 미생물(예를 들어, 속, 종 또는 균주와 같은 범주에 속하는 미생물)의 특성이 될 수 있고 상기 미생물을 확인하는데 기초로 사용될 수 있다. 따라서, 상기 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열은 모티프(motif) 또는 특징, 또는 주어진 특정 미생물의 서열 특성으로 볼 수 있다. 일반적으로, 상기 서열은 특정 미생물(예를 들어, 속, 종 또는 균주 수준에서)에 독특할 것이다. 상기와 같이 미생물을 확인하게 해 주는 많은 서열들이 확인 및 보고 되었으며, 이들 중 어느 서열들은 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 서열은 16s rRNA 유전자로부터의 핵산 서열일 수 있다. 또는, 이러한 모티프/특징/미생물을 확인하게 해주는 서열들을 확인하고 (예를 들어, 생물정보학적인 도구들을 사용하여 미생물 게놈 서열들을 확인하는 것), 얻어진 결과를 바탕으로 동정된 서열들에 혼성화할 수 있는 서열들을 포함하여 적합한 혼성화 탐침을 제작하는 것은 일반적으로 행해지는 연구 활동이다.

[0117] 또는, 혼성화 탐침들을 사용하기보다는, 하나 이상의 프라이머들이 사용될 수 있고, 프라이머 기반 방법(예를 들어, 중합효소 프라이머 연장-기반 방법)이 미생물 검출 및 확인을 위해서 사용될 수 있다. 전형적으로, 이는 증폭 방법(가장 일반적으로 PCR)일 것이나, 다른 증폭 방법들 또는 프라이머 연장 방법들(예를 들어, LCR, NASBA, MDA 등)이 사용될 수 있다. 프라이머 또는 프라이머들의 세트는 상기 미생물 존재 여부를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화 하거나, 또는 상기와 같이 혼성화하여 (예를 들어, 상기 서열 양 끝에 위치하여) 상기 서열을 증폭할 수 있다. 용어 "증폭된"은 본 명세서에 광범위하게 사용되는데 (상기 참조), 이는 상기 미생물 존재 여부를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열 및 표지 서열의 카피(copy)(상보적인 카피 포함)를 제공하는 어느 방법을 지시할 수도 있고, 단순한 프라이머 연장 반응 및 지수 증폭 뿐만 아니라 선형 증폭을 지시할 수도 있다. PCR 수행시, 프라이머 쌍은 미생물 존재 여부를 확인할 수 있도록 하는 각각의 뉴클레오타이드 서열에 대해 사용될 수 있다.

[0118] 즉, 본 발명에서 사용되는 상기 혼성화 탐침들 또는 상기 프라이머들은 미생물의 존재를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열(i) 또는 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열(ii) 에 특이적일 수 있다.



- [0119] 따라서, 본 발명의 방법에서 상기 기술된 (e) 단계는 아래와 같이 다른 방식으로 기술될 수 있다:
- [0120] e) 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는 단계, 상기 핵산 검사는:
- [0121] i) 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들(각각의 상기 탐침 및/또는 프라이머는 특정 미생물을 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적임); 및
- [0122] ii) 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 및/또는 프라이머들(각각의 상기 탐침 및/또는 프라이머는 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적임)을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하며;
- [0123] 상기 핵산 검사를 통해 상기 탐침들 및/또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 연장되었는지(즉, 증폭 반응이 발생되었는지) 여부가 결정되는 것을 특징으로 한다.
- [0124] 상기 기술된 바와 같이, 상기 검출 단계는 상기 탐침이 이의 표적 뉴클레오타이드 서열에 혼성화한 후에 상기 탐침을 증폭하는 것을 포함하거나 또는 이와 연관될 수 있다. 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이, 혼성화에 의존해 증폭이 발생할 수 있도록 상기 탐침이 제작될 수 있다. 따라서, 오직 혼성화되는 탐침만이 증폭될 수 있다.
- [0125] 이러한 방법을 따라, 선별된 미생물들의 핵산에 혼성화 할 수 있거나 또는 상기 핵산을 증폭할 수 있으며 이로써 상기 검사용 부분 표본 (및 시료)에 미생물이 존재하는지 여부를 검출할 수 있는 혼성화 탐침들 또는 프라이머들의 세트 또는 집합이 모아지거나 및/또는 제작될 수 있다. 미생물이 존재하는지 검출함으로써 (즉, 동정 탐침이 혼성화되었는지, 또는 프라이머 및 프라이머 세트가 연장되었는지 또는 증폭 반응이 발생할 수 있도록 준비를 시켰는지를 검출함으로써), 상기 시료에서 미생물 존재 여부를 확인할 수 있다. 예로써, 상기 혼성화 탐침들 또는 상기 미생물 동정용 프라이머들은 탐침들 또는 프라이머들을 포함할 수 있는데, 각각의 탐침 및 프라이머는 미생물들(예를 들어, 주요하거나 또는 가장 일반적으로 알려진 패혈증 병원균들)의 선별된 세트 중 하나를 특이적으로 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 제공되는 특정 세균 및 곰팡이 종의 목록들은 가장 일반적인 패혈증 병원균들 중 약 95%를 나타내고, 본 발명에 따른 대표적 미생물 집합을 구성할 것이다.
- [0126] 따라서, 동정 탐침들 및/또는 프라이머들 (또는 프라이머 세트들)의 다양성은 (e)(i) 단계에서 유리하게 작용할 것이다. 본 명세서에서 상기 다양성은 두 가지 이상, 또는 특히 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 200, 300, 400 또는 500 이상으로 광범위하게 정의된다. 동정될 다른 여러 미생물들에 더하여, 다른 탐침들 또는 프라이머들 및 프라이머 세트들이 특정 미생물의 검출을 위해 사용될 수 있으며, 예를 들어, 표적 미생물 당 2, 3, 4, 또는 5 또는 그 이상의 탐침들이 사용될 수 있다. 미생물들의 집합은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 이상(예를 들어, 60, 70, 80, 90 또는 100 까지)의 미생물들을 포함 할 수 있기 때문에, 일반적으로 적어도 30 이상(예를 들어, 50, 70, 80, 100, 200, 300, 400 또는 500 이상)의 동정 탐침들 또는 프라이머들 (또는 프라이머 세트들)의 집합 또는 세트가 사용될 것이다. 당 기술 분야에서 알려진 절차들에 따라, 탐침 또는 프라이머-기반 핵산 검사는 수천 또는 수천 수만의 탐침들 또는 프라이머들을 복합적으로 사용할 수 있을 것이고, 본 발명은 이러한 절차들을 포함한다.
- [0127] 두번째로, 본 발명의 방법의 (e)(ii) 단계에서, 상기 혼성화 탐침들 또는 상기 프라이머들에 상응하는 상기 표적 서열은 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열이다. 상당수의 이러한 표지들은 당 기술 분야에서 확인되고 보고되었고, 이들을 검출하는 혼성화 탐침들 및 프라이머들이 고안되었으며, 이들 중 어느 탐침들 및 프라이머들은 바로 사용될 수 있고, 그렇지 않으면 추가의 탐침들 또는 프라이머들이 상기 동정된 표지 서열들에 기반하여 제작될 수 있다. 또한, 추가적인 표지 서열들이 일반적인 탐색 방법들에 의해 동정될 수 있다. 상기 항균제 내성 표지는 내성 메카니즘에 관여하는 구성 요소를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있는데, 상기 구성 요소로는 예를 들어, 효소 또는 변형된 단백질일 수 있거나, 또는 항균제 내성과 연관되는 것으로 확인된 단순한 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 변이체일 수 있다.
- [0128] 일 예로서, 베타-락타마제( $\beta$ -lactamase)는 세균이 항생제들에 대한 내성을 갖게 하는 메카니즘에서 중요한 역할을 하고, 일부 항생제 종류에 대해 내성을 갖게 한다. 확장된 스펙트럼 베타-락타마제(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL)를 형성할 수 있는 세균(확장된 스펙트럼 베타-락타마제-형성 세균)이 최근에 출현하였는데, 상기 확장된 스펙트럼 베타-락타마제는 급속도로 진화하고 있는 미생물의 내성을 단적으로 보여주는 일 예이다. 매우 다양한 베타-락타마제를 동정할 수 있는 탐침들이 보고되고 있다 (Barisic *et al*, 2013, Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 77(2), 118-125 참조). 알려진 다른 유전적 내성 표지들로는 *mecA*, *mecC*,



vanA, vanB, CTX-M, KPC, VIM, NDM, 및 OXA-48를 포함한다. 시프로플록사신(ciprofloxacin) 내성 돌연변이들 동정되었고 (예를 들어, 항생제 내성 *F. tularensis*, *B. anthracis* 및 *Y. pestis*에서), 이들은 이용 가능하다.

[0129] 혼성화 탐침들은 다양한 형태들을 가질 수 있고, 상기 혼성화 탐침은 최소 단위로 상기 표적 서열과 혼성화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고 추가의 서열 또는 잔기를 더 포함할 수 있는데, 상기 추가 서열 및 잔기에 의해 상기 혼성화 탐침이 직접적 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 따라서, 상기 탐침은 직접적 또는 간접적으로 검출 가능한 표지와 함께 제공될 수 있는데, 상기 표지의 예로는 분광 광도법으로 (예를 들어, 형광을 사용하여) 검출 가능한 표지, 또는 리포터(reporter) 분자 또는 잔기를 들 수 있는데, 상기 리포터 분자 또는 잔기는 예를 들어, 효소, 효소 기질, 또는 보조 인자가 관여하는 신호-공여 또는 신호 발생 반응에 참여할 수 있고, 또한 상기 리포터 분자 또는 잔기는 친화성 태그(tag)의 형태로 제공될 수 있는데, 이를 사용함으로써 상기 혼성화 반응 후에 상기 탐침을 선별적으로 표지화하거나 또는 선별적으로 격리 또는 분리할 수 있다. 표지화하는 다른 형태들 및 표지화된 핵산 탐침들은 널리 알려져 있고 보고 되었는데, 그 예로는 분자 비콘(beacon) 및 다른 프렛(FRET) 기반 탐침들을 들 수 있다. 하지만, 상기 탐침 안 또는 상에 제공되는 표지 또는 리포터 잔기를 이용하여 혼성화된 탐침의 존재를 직접적으로 검출하기 보다는, 상기 탐침은 간접적으로, 예를 들어, 상기 탐침의 증폭 산물을 검출 함으로서 검출될 것이다. 다른 혼성화 탐침 구성방식들은 알려져 있고, 이들 중 어느 방식들은 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 분자 도치 탐침들, 스콜피온(scorpion) 탐침, 및 자물쇠(padlock) 탐침들이 있다.

[0130] 예를 들어, 분자 도치 탐침들 및 자물쇠 탐침들은 이들의 표적 서열에 혼성화한 후에 결찰에 의해 원형화되도록 제작되고, 상기 혼성화의 결과로 발생하는 원형화된 탐침은 증폭(예를 들어, 회전환 증폭(rolling circle amplification, RCA))에 의해 검출될 수 있다.

[0131] 본 발명에 따르면 자물쇠 탐침은 바람직한 유형의 혼성화 탐침이다. 자물쇠 탐침은 최초로 1994년 (Nilsson 외, 1994, Science, 265, 2085-2088 참조)에 기술되었고, 그 이후로 발전하여 다양한 뉴클레오타이드 서열들을 검출하는데 폭넓게 사용되었으며, 폭넓은 범위의 분자들에 대한 분석시험에 리포터로 더 널리 사용되었다 (예를 들어, 유럽특허 제0745140호, 제0964704호, 및 제0951565호 및 Hardenbol 외, 2003. Nat. Biotechnol. 21, 673-678 참조). 자물쇠 탐침의 5' 및 3' 말단에 위치한 서열은 표적 뉴클레오타이드 서열과 혼성화 할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 자물쇠 탐침의 5' 및 3' 말단은 상기 뉴클레오타이드 서열과 혼성화할 수 있고, 그 결과 두 말단은 서로 직접적으로 인접하게 된다. 또 다른 구체예에서, 상기 자물쇠 탐침의 5' 및 3' 말단은 상기 뉴클레오타이드 서열과 혼성화 할 수 있고, 그 결과 두 말단은 서로 직접적으로 인접하지 않는다. 이 경우 중합효소의 작용으로 혼성화된 3' 말단을 연장함으로써 또는 틈을 메울 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써 두 말단 사이의 틈이 채워질 수 있다. 그런 다음, 상기 말단들은 서로 결찰되어 핵산 원형을 형성할 수 있고, 이후에 상기 핵산 원형은 회전환 증폭-기반 방법들에 의해 편리하게 검출될 수 있다. 결찰이 요구되는 것과 더불어 두 개의 인식 부위들(즉, 두 개의 혼성화 부위들)은 있다는 것은 자물쇠 탐침이 복잡한 계층 배경에서 유일한 서열을 검출하기에 매우 특이적이고 아주 적합한 것을 지시한다. 단일-분자 원형화 접근법 및 상기 원형화된 탐침의 상기 회전환 증폭-기반 검출은 복합적인 검출에 적합하고, 상당수의 탐침들이 조합되어 사용될 수 있고 간섭 문제 없이 함께 증폭될 수 있다.

[0132] 하지만, 비록 회전환 증폭이 원형화된 자물쇠 탐침을 검출하는데 바람직한 방법이지만, 본 발명은 이에 한정되지 않고 예를 들어 PCR을 포함하는 다른 증폭 방법들, 또는 다른 검출 방법들(예를 들어, 선형 말고 원형 핵산을 선별적으로 검출하는 것에 기반을 둔 검출 방법들)이 사용될 수 있다.

[0133] 회전환 증폭에 적합한 사슬 치환(strand-displacing) 중합효소가 알려져 있는데, 그 예로서 파이-29( $\phi$ -29) 중합효소가 있다.

[0134] 원형화된 자물쇠 탐침이 회전환 증폭에 의해서 증폭되면 수많은 자물쇠 탐침 서열의 반복이 발생되어 연쇄체의 회전환 증폭 산물이 형성된다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 회전환 증폭 산물은 형광으로 표지화된 검출 올리고뉴클레오타이드의 혼성화에 의해 검출될 수 있다.

[0135] 상기 회전환 증폭 반응은 선형 증폭이기 때문에, 증폭 효율이 낮다. 이에 증폭을 강화시키고 회전환 증폭으로부터 얻어지는 신호를 증가시키는 상당수의 방법들이 개발되었으며, 그 예로는 하이퍼브랜치형(hyperbranched) 회전환 증폭방법이 LIZARDI에 의해 개발되었다 (미국특허 제6,183,960호 및 제6,143,495호 참조). 이러한 방법들 중 어느 방법들은 사용될 수 있다. 또한, 상기 회전환 증폭 산물은 PCR에 의해 더 증폭될 수 있거나, 또는 핵산을 증폭하는 어느 다른 방법이나 또는 신호를 증폭하는 어느 방법이 사용될 수 있다.

- [0136] 회전환 증폭을 증가시키는 특별히 유용한 방법은 서클-투-서클 증폭(circle-to-circle amplification, C2CA)이다. 상기 방법은 학술지(Dahl 외, 2004, PNAS USA, 101, 4548-4553 참조) 및 국제공개공보 WO 제03/012199호에 기술되었다. 서클-투-서클 증폭 방법에 따르면, 첫 번째 회전환 증폭 반응으로부터 얻어진 연쇄체의 회전환 증폭 산물(rolling circle amplification product, RCP)을 단량체들로 분할되고 (예를 들어, 각각의 단량체는 연쇄 동일 서열의 일렬 반복에 해당됨, 즉, 상기 원형화된 자물쇠 탐침의 상보적인 복제임), 그 다음 상기 단량체들을 다시 원형화하여, 이에 생성된 각각의 원형화된 단량체는 계속되는 회전환 증폭 반응(즉, 회전환 증폭 반응 사이클을 더 수행하여)에서 주형으로 사용될 것이다. 상기 반응은 일회 이상 반복될 수 있고, 반복된 회전환 증폭으로 상기 신호가 증폭된다.
- [0137] 상기 회전환 증폭 산물의 분할은 상기 회전환 증폭 산물의 각각의 반복(즉, 단량체가 될 부분)에 존재하는 서열(제한효소 절단위치 서열)에 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 함으로써 이루어질 수 있다. 즉, 상기 혼성화에 의해 이중 가닥의 제한효소 절단 또는 인식 위치가 형성되고 제한 효소에 의해 분할되어 결과적으로 상기 회전환 증폭 산물이 단량체들로 분할된다. 상기 동일한 올리고뉴클레오타이드는 (예를 들어, 과량으로 첨가되어) 상기 분할에 의해 생성된 상기 단량체들의 원형화를 위한 결찰 주형으로 사용될 수 있다. 분할 후에 단일 가닥의 단량체들을 생성하기 위해 변성 단계가 포함될 수 있는데, 이는 과량으로 첨가된 분할되지 않은 올리고뉴클레오타이드에 상기 단량체들이 혼성화하는데 필요하다.
- [0138] 상기 서클-투-서클 증폭 반응의 변형은 본 발명과 함께 출원 중인 2013년 11월 29일에 제출된 영국특허출원 제 1321123.0호에 기술되었고, 본 발명의 참조로서 기재된다. 상기 변형된 서클-투-서클 증폭 절차에 따르면, 회전환 증폭의 두 번째 또는 이어지는 어느 라운드(round)의 효율은 원형화된 단량체들의 크기를 줄임으로써 향상된다. 즉, 회전환 증폭의 두 번째 라운드에서 사용되는 원형 주형은 상기 첫 번째 회전환 증폭에서의 주형(즉, 상기 원형화된 자물쇠 탐침)에 비해 크기가 줄어들게 됨으로써, 상기 두 번째 (및 이어지는) 회전환 증폭 반응의 속도는 빨라지게 되는 것이다. 상기 기술된 임박한 출원서에서는 생성되는 단량체들의 크기를 줄이거나 다른 방식으로 단량체들의 크기를 줄이는 단계에 영향을 줄 수 있는 회전환 증폭 산물을 분할하는 다양한 방법들이 기술된다.
- [0139] 또한, 두 번째 회전환 증폭 반응을 수행함으로써 회전환 증폭 반응으로부터 생성되는 신호를 증폭하는 다른 방법들이 보고되었고 이들중 어느 방법들이 사용될 수 있다. 상기 방법으로는 국제공개공보 WO 제2014/076209호에 기술된 Olink AB사의 슈퍼 회전환 증폭(superRCA, sRCA) 방식이 있다. 상기 방법의 절차에서는 두 번째 수행되는 회전환 증폭 반응은 첫 번째 회전환 증폭 반응에 의존적이나, 첫 번째 회전환 증폭 산물을 증폭하지는 않는다. 상기 두 번째 회전환 증폭 산물은 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물에 물리적으로 붙어있게 되는데, 이로써 상기 두 번째 회전환 증폭 산물로부터의 신호가 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물에 위치하게 된다. 두 번째 회전환 증폭을 위한 원형 주형을 증폭하기 위해 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물에 (직접적 또는 간접적으로) 혼성화하는 회전환 증폭 프라이머를 활용하여, 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물에 (프라이머가 혼성화하려는 힘이 작용하여) 혼성화하여 달라 붙는 상기 회전환 증폭 프라이머를 연장하여 상기 두 번째 회전환 증폭 산물이 생성될 수 있다. 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물은 상기 첫 번째 회전환 증폭 반응에서 원형 형태인 주형에 상보적인 일렬로 반복되는 복제물들을 포함하는 연쇄 동일 서열이기 때문에, 상기 두 번째 회전환 증폭에서의 상기 회전환 증폭 프라이머는 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물에서 반복적으로 존재하는 동족의 프라이머 결합 서열에 결합할 것이다. 즉, 상기 첫 번째 회전환 증폭 산물은 상기 두 번째 회전환 증폭 반응에서 작용하는 상기 회전환 증폭 프라이머가 결합할 수 있는 반복되는 결합 부위들을 포함할 것이며, 이때, 상기 일렬 반복들에서 각각(상기 연쇄 동일 서열의 "단량체")은 하나의 상기 프라이머 결합 부위가 존재할 것이다. 각 단량체에 있는 프라이머 결합 위치에 결합한 상기 각각의 프라이머는 두 번째 회전환 증폭 반응에 참여하게 되고, 그 결과 선형 증폭보다 더 많은 증폭을 가능하게 한다.
- [0140] 회전환 증폭 또는 서클-투-서클 증폭 반응의 결과물인 회전환 증폭 산물을 검출 하는데 있어, 상기 기술된 바와 같이, 예를 들어, 상기 회전환 증폭 산물의 일렬 반복들에 존재하는 서열들과 혼성화할 수 있는 표지화된 검출 올리고뉴클레오타이드를 이용하거나 또는 상기 회전환 증폭 산물에 표지화된 검출 올리고뉴클레오타이드를 포함 시킴으로써 직접적으로 검출할 수 있고, 또는 상기 회전환 증폭 산물로부터 방출되는 단량체들을 검출함으로써 간접적으로 검출할 수 있다.
- [0141] 매우 긴 핵산 연쇄 동일 서열(전형적으로, 원형 주형 서열의 500-1000 카피를 포함)로 이루어진 상기 회전환 증폭 산물은 불규칙적인 코일 모양의 무정형의 "방울" 또는 DNA 덩이로 되는데, 이러한 형태는 쉽게 검출되고 실제로 시각화할 수 있다. 따라서, 상기 방울들은 현미경 또는 어느 다른 편리한 수단을 사용하여 이미지화 또는 관찰될 수 있으며, 이를 통해서 상기 자물쇠 탐침들이 이들의 표적 서열들에 혼성화(및 혼성화 이후에 회전환

증폭/서클-투-서클 증폭에 의해 결찰 및 검출)된 것을 (간접적으로) 검출할 수 있다. 또한, 상기 회전환 증폭 산물을 검출하는 다른 수단도 있는데, 그 예로 유동 세포 분석법이 있을 수 있고, 또는 고체 지지체 상에 상기 회전환 증폭 산물을 포획하고 표지화된 검출 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 표지화 수단(예를 들어, 표지화된 올리고뉴클레오타이드를 핵산 서열에 포함시키거나 핵산 착색제 또는 염료 등을 사용)을 이용하여 상기 증폭 산물을 검출하는 방법이 있다.

[0142] 상기 회전환 증폭 산물 방울의 검출은 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD)에 있어 편리한 수단을 제공한다. 세균 및 포자들을 검출하기 위해 서클-투-서클 증폭에 기초한 상기 방법을 사용하고 회전환 증폭 산물 방울들의 수를 측정하는 것은 학술지(Goransson 외, 2012 PLOS one, 7(2), e31068 참조)에 기술된 바 있고, 본 발명에 따라 상기 방법은 사용될 수 있다. 상기 회전환 증폭 산물 방울에서 표지가 집중 또는 농축된 것은 주변 용액에 비해 상기 방울에서 표지가 높은 농도로 존재한다는 것을 지시한다. 이러한 방법을 통해서 세척하는 단계를 생략할 수 있고, 균질한 방법들이 사용될 수 있다 - 반응 산물들은 유동 세포에서 쉽게 검출될 수 있다 (Jarvius 외, 2006, Nature Methods, 3, 725-727 참조).

[0143] 또는, 상기 회전환 증폭 산물인 연쇄 동일 서열을 검출하기 보다는, 상기 회전환 증폭 산물은 단량체들로 분할되어, 상기 단량체들이 검출될 것이다. 그 다음으로 상기 단량체들의 검출은, 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이, 또는 당 기술 분야에서 잘 알려진 원리에 따라, 상기 단량체들에 직접적으로 포함되는 표지를 이용하거나 또는 상기 단량체들에 검출 올리고뉴클레오타이드를 혼성화함으로써 이루어질 것이다. 예를 들어, 상기 단량체들은 마이크로어레이(microarray)에 결합되고, 어레이(array)에 결합된(혼성화된) 단량체들은 표지화된 올리고뉴클레오타이드의 혼성화에 의해 검출될 수 있다. 따라서, 상기 회전환 증폭 산물 단량체들에 결합(혼성화)할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 어레이가 제공될 것이다 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드가 어레이 상에 놓여져 있는 형태로 제공될 것이다). 상기 어레이에 포함되는 올리고뉴클레오타이드는 상기 회전환 증폭 산물 단량체들에 상보적으로 제작되어, 아민기, 티올기 또는 에폭시드기를 통해 어레이 기판에 공유 결합되거나 또는 어느 다른 화학적 연결 방법으로 연결될 수 있다. 또는, 상기 올리고뉴클레오타이드는 포토리소그래피(photolithography)와 같은 방법을 사용하여 상기 어레이 상에서 인시츄(*in situ*) 합성될 수 있다. 그 다음 당 기술 분야에서 잘 알려진 방법들에 따라 상기 어레이는 스캔(scan) 또는 이미지화되고 분석될 수 있다. 따라서, 특정 회전환 증폭 산물 단량체가 상기 어레이에 혼성화되었는지 여부를 검출함으로써, 특정 자물쇠 탐침이 이의 표적에 혼성화 했는지 여부 그리고 결찰 및 증폭이 발생했는지 여부가 확인될 수 있다.

[0144] 따라서, 본 발명의 일부 구체예들에서, 고체 상(solid phase)-기반 방법들이 사용될 수 있다. 상기 방법들의 다양한 단계들을 수행하기 위해 고체 지지체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 회전환 증폭 산물 단량체들을 검출할 수 있는 상기 어레이 검출에 더하여 또는 이에 대한 대안으로, 상기 방법의 초기 단계들에 고체 상이 사용될 수 있다. 일 구체예에서는, 상기 분자 검사에서 사용되는 상기 검사용 부분 표본으로부터 분리된 DNA에 존재하는 표적 DNA는 고체 지지체 상에 고정될 수 있다. 따라서, (e) 단계에서 수행되는 분자 검사들에서 표적이 되는 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 DNA 단편들 또는 DNA 분자들은 포획 탐침들을 사용하여 (d) 단계의 분리된 DNA로부터 선별적으로 포획될 수 있다 (예를 들어, 상기 분자 검사가 수행되기 전 또는 동시에). 상기 표적 DNA에 혼성화하는 포획 탐침들은 사용될 수 있다 (핵산 동정 및 내성 검출을 위해 사용되는 상기 탐침들 및 프라이머들이 혼성화하는 위치들과는 구분되는 위치에서). 예를 들어, 미생물 동정 및 내성 검출을 위해 상기 탐침들 또는 프라이머들을 첨가하기 전에 또는 이와 동시에 상기 포획 탐침들은 상기 분리 또는 농축된 DNA에 첨가될 수 있다. 상기 포획 탐침들은 고정화되거나 고정화를 위한 수단들과 함께 제공될 수 있고, 상기 탐침은 상기 표적 DNA에 결합된 후에 고정될 수 있다. 상기 고정화를 위한 수단들은 예를 들어 친화성 분자를 포함할 수 있는데, 상기 친화성 분자는 고체 지지체 상에 제공되는 동족 결합 파트너에 결합할 수 있다. 대표적인 예로써, 상기 고체 지지체에 연결된 스트렙타아비딘(streptavidin) 또는 아비딘(avidin)(또는, 이의 변이체)에 결합하기 위해서 상기 포획 탐침은 비오틴으로 부착될 수 있다. 당 기술 분야에서 알려진 바와 같이, 어느 편리한 고체 지지체들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 고체 지지체는 마이크로어레이, 블러팅 막(blotting membrane), 젤, 현미경 슬라이드, 구멍을 포함하는 평판, 튜브 또는 다른 용기, 또는 비드 또는 입자(예를 들어, 유리, 고분자, 플라스틱 또는 자석 비드 또는 입자)를 포함할 수 있다. 또는, 상기 표적 DNA 분자를 상기 고체 지지체 상에 직접적으로 고정화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 비오틴이 부착된 포획 올리고뉴클레오타이드를 통해 스트렙타아비딘이 접합된 고체 지지체 상에 상기 표적 DNA 분자는 고정화될 수 있다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 표적 DNA 분자는 비오틴으로 부착되어 스트렙타아비딘이 접합된 고체 지지체에 고정될 수 있다.

[0145] (e) 단계의 분자 검사들이 수행되는 동안, 상기 임상 시료를 포함하고 있는 상기 배양용기는 계속 배양되거나



(만약 전배양 단계가 수행되었으면) 또는 배양 단계를 거치게 된다 ((c) 단계). 상기 기술된 바와 같이, 배양은 단순히 미생물 성장에 적합하거나 또는 도움이 되는 조건하에서 상기 배양용기를 항온처리하는 것과 연관된다. 따라서, 상기 단계는 상기 전배양에 대해 지시된 것 처럼 수행될 수 있다. 상기 단계에 따르면, (e) 단계에서 미생물 동정을 위한 분자 검사에서 양성의 결과가 얻어지지 못 할 경우, 종래의 표현형 및/또는 생화학적 검사들 및 전통적인 배양에 기반을 둔 미생물 동정 프로토콜(protocol)에 상기 시료를 사용할 수 있거나, 또는 어느 다른 수단을 사용하여 상기 시료를 추가의 미생물 동정 검사에 사용할 수 있으며, 이 경우 배양이 계속 진행되고 있기 때문에 상기 검사는 지연되지 않고, 추가의 임상 시료가 채취될 필요가 없거나, 또는 추가의 배양이 시작될 것이다. 실제로 이때에, (e) 단계에서 미생물이 동정되지 않을 경우, 상기 시료는 계속 배양되거나, 또는 상기 배양용기는 또 다른 배양 시스템(예를 들어, 자동화된 배양 시스템 또는 미생물 동정 및 선택적으로는 항균제 감수성 검사를 위해 제작된 배양 케비넷)으로 옮겨질 수 있다. 적절한 배양 기간 후에, 상기 추가의 미생물 동정 검사 및 감수성 검사는 수행될 수 있으며, 후자의 경우를 예로 들자면 종래의 항생제 감수성 검사(예를 들어, 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정하기 위한 비탁분석으로 평가되는 액체 배지 희석 배양(turbidimetrically-assessed broth dilution culture) 또는 원반 확산 실험(disc-diffusion test))를 사용하여 수행될 수 있다.

[0146] 상기 검사용 부분 표본에서 미생물이 동정될 경우, (c) 단계에서 배양되어져 온 임상 시료에 대해 항균제 감수성 검사가 수행된다. 편리하게는, 상기 단계는 상기 배양용기로부터 부분 표본을 추가로 (예를 들어, 분자 검사를 위해 채취된 부분 표본의 양에 의존하여, 두 번째 또는 그 이상의 부분 표본 채취) 빼내거나 또는 제거하고, 제거된 상기 부분 표본에 대해 항균제 감수성 검사가 수행되는 것과 연관될 수 있다.

[0147] 또한, 본 발명의 방법은 상기 부분 표본 또는 배양된 임상 시료에서 미생물들을 농축하는 단계에서 추가의 단계를 포함할 수 있다. 이를 위한 적합한 절차들은 상기에 기술되고, 상기 부분 표본 및 배양된 시료로부터 미생물 이외의 세포(즉, 검사 대상인 피험자의 세포)를 제거 또는 분리하는 것을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 미생물 세포는 여과를 통해 분리될 수 있다.

[0148] 인정 및 규정된 항균제 감수성 검사에 대한 조건들을 준수하여 검사를 진행하여 다른 연구실들에서 수행된 검사들과 비교할 수 있는 검사 결과들을 얻을 수 있다. 예를 들자면, 이는 규정된 배지 및 배양 조건들을 사용하는 것과 연관된다. 따라서, 상기 항균제 감수성 검사를 위해 추가로 채취된 부분 표본(또는 부분 표본 일부 및 나머지 등) 또는 상기 부분 표본으로부터 분리 또는 농축된 미생물들은 상기 항균제 감수성 검사 개시 전에 미생물 배양에 적합한 배지(예를 들어, 물러-힌트(MH) 배지)로 옮겨질 수 있다. 미생물들은 특정 항균제에 대한 이들의 감수성을 결정하기 위해 여러 가지 항균제들의 존재하에 배양될 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 항균제들은 미생물의 종류 및 미생물에서 확인된 어느 유전적 항균제 내성 표지들의 고유 특성에 기초하여 선택된다. 또한, 상기 항균제들 및 이들의 사용되는 양은 현재 시행되고 있는 임상 시험에 따라 선별될 수 있는데, 예를 들어, 동정된 미생물을 제거하기 위해 현재 실제로 사용되는 항균제들에 따라 상기 항균제 종류 및 사용량이 결정될 수 있으며, 이로써 선택된 현재 용인 및 인정된 항균제 처리에 대한 미생물의 감수성이 평가될 수 있다. 따라서, 상기 항균제들은 상기 동정된 미생물에 대해 효과적인 것으로 알려진 기존의 항균제들 또는 상기 미생물을 제거하는데 실제로 현재에 사용되고 있는 기존의 항균제들을 기반으로 하여 선별될 수 있다. 한편 상기 미생물에 존재하는 항균제 내성 표지들에 근거하여 내성에 의해 효과가 없을 것으로 예상되는 항균제들은 제외되거나, 또는 내성 표지가 있음에도 불구하고 효과적으로 미생물을 제거할 수 있는 항균제의 양 또는 농도를 결정하기 위해 상기 항균제들도 포함되어 이들의 사용량이 결정될 수도 있다. 선별된 항균제들은 다양한 최종 농도 또는 양으로 성장 배지에 첨가된다. 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 상기 항균제의 연속 희석(serial dilution)을 수행될 수 있다.

[0149] 상기 항균제 감수성 검사에서 시료 및 시료에 있는 미생물을 성장 또는 배양하는 단계는 어느 알려진 또는 편리한 수단을 이용해 수행될 수 있다. 고체상 또는 액체상 배양이 사용될 수 있다.

[0150] 따라서, 일 바람직한 구체예에서, 시료 및 미생물은 항균제를 함유하고 있는 평판 또는 고체 배지 상 또는 안에서 배양될 수 있고 미생물 성장은 상기 미생물을 시각화(예를 들어, 이미징)함으로써 (즉, 상기 평판 등을 이미징하여) 결정될 수 있다. 따라서, 상기 배양은 성장을 관찰 또는 평가하기 위해 직접적으로 시각화 또는 이미징화 된다. 따라서, 바람직한 일 구체예에서, 상기 배양은 성장을 관찰 및 평가하기 위해서 직접적으로 분석된다. 예를 들어, 상기 배양은 평판의 구멍들에서 배양될 수 있고 상기 구멍들은 이미징화될 수 있다.

[0151] 또는, 시료들(또는 부분 표본들)은 간격을 두고 또는 다른 시점들에서 상기 배양으로부터 제거(또는 채취)되어 미생물 성장을 평가하기 위해 분석될 수 있다. 상기 분석은 예를 들어 분자 검사(예를 들어 핵산 기반 검사)와

같은 어느 수단들을 사용하여 수행될 수 있다. 따라서, 미생물 세포 또는 미생물 세포로부터 방출 또는 분리되는 구성 성분들과 결합하는 검침 탐침들 및/또는 프라이머들이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 상기 기술된 (e) 단계의 동정 검사에서 사용되는 핵산 탐침들 또는 프라이머들이 이에 포함될 수 있다. 다른 구체예들에서, 하기에 더 자세히 기술되는 바와 같이 미생물 세포는 예를 들어 염색에 의해 직접적으로 검출될 수 있다.

[0152] 미생물이 성장할 수 있는 항균제가 없는 양성 대조군에 더하여, 적어도 하나의 농도로 각 항균제가 사용되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 가지 이상의 농도로 항균제가 사용된다. 연속 희석에서는 각각의 농도간에 두배의 차이가 나도록 하여 농도 시리즈가 구성될 수 있다.

[0153] 용어 "항균제"는 미생물을 죽이거나 이의 성장을 억제하는 어느 물질들을 포함한다. 본 발명의 항균제들은 특히 항생제들 및 항진균제들을 포함할 수 있다. 항균제들은 살균제 또는 미생물 발육 저지제일 수 있다. 다양하고 다른 종류의 항생제들이 알려져 있고, 균류 또는 특별히 균류의 군들에 대항해 활성을 가지는 항생제들을 포함하고, 이들 중 어느 또는 모두가 사용될 수 있다. 항생제들은 베타 락탐 항생제들, 세팔로스포린계, 폴리믹신계, 리파마이신계, 리피아마이신계, 퀴놀론계, 설펜아미드계, 마크로라이드계, 린코사마이드계, 테트라사이클린계, 아미노글리코사이드계, 사이클릭 리포펩티드계, 글라이실사이클린계, 옥사졸리디논계, 리피아마이신계 또는 카바페넴계들을 포함할 수 있다. 본 발명에서 바람직한 항진균제들로는 폴리엔계, 이미다졸계, 트라이azole 및 티아졸계, 알릴아민계 또는 에치노칸딘계들을 포함할 수 있다.

[0154] 따라서, 항균제 감수성은 채취된 부분 표본 (또는 부분 표본 일부 등) 또는 (c) 단계의 배양된 임상 시료 또는 상기 임상 시료로부터 분리 또는 농축된 미생물을 배양하고 다양한 시점들에 걸쳐 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양물들을 분석함으로써 결정될 수 있다. 상기 배양 단계에서는, 항균제 감수성 검사를 위한 배양은 미생물 성장을 촉진하는 어느 온도에서 수행될 수 있을 것으로, 예를 들어, 약 20에서 40 °C 사이 또는 약 20에서 37 °C 사이, 바람직하게는 약 25에서 37 °C 사이, 더 바람직하게는 약 30에서 37 °C 사이 또는 약 30에서 35 °C 사이의 온도 범위에서 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양은 약 35 °C에서 이루어질 수 있다. 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양은 미생물 성장을 관찰하기 위해서 다수의 시점들에서 분석될 수 있다. 예를 들어, 상기 배양은 배양 시작 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 시간의 시점들에서 분석될 수 있다. 상기 배양은 배양 시작 후 즉시 분석될 수 있는데, 이는 t=0의 시점에 해당된다. 상기 배양은 배양 시작 후 24 시간이 지난 시점들에서도 분석될 수 있다. 일반적으로, 상기 배양은 배양 시작 후 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 24 시간에서 분석된다. 하지만, 하기의 실시예들에서 얻어거나 또는 보고된 결과들은 짧은 배양 시간(예를 들어, 4 시간)만으로 다른 미생물 성장을 검출하기에 충분하다는 것을 보여준다. 따라서, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2 시간까지의 짧은 전체 배양 시간이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 매 시간 또는 매 2 시간 또는 매 90 분 마다 분석이 이루어질 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 일반적으로 상기 배양은 두 가지 이상의 시점들에서 분석되는데, 예를 들어, 4, 5 또는 6 시간까지의 배양 시간 동안 두 가지 이상의 시점에서 분석된다.

[0155] 본 발명은 상기 항균제 감수성 검사 동안 미생물 성장을 관찰하는 것을 필요로 한다. 미생물 성장을 관찰하는 많은 방법들이 알려져 있고 상기 항균제 감수성 검사에 사용될 수 있으며, 그 예로는 비탁 분석, 비색 판별, 광검출, 광 산란, pH 측정, 분광 측정 및 형광 검출을 포함한다. 이들 중 어느 방법들은 사용될 수 있다. 하지만, 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 이미징 방법들을 사용해 상기 시료에서 미생물 세포들의 수 및/또는 양 및/또는 크기 및/또는 영역을 결정 또는 평가함으로써 미생물 성장이 검출 및 평가될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 상기 미생물 세포들은 집락들 및/또는 집합체들에 있는 세포들을 포함할 수 있다. 상기 미생물 성장의 관찰은 미생물을 측정 또는 검출할 수 있는 방법들 중 어느 방법에 의해 항균제들의 존재하에서 성장이 진행되는지 전 및/또는 성장이 진행된 후에 상기 시료에 존재하는 미생물의 수 또는 양을 평가 또는 결정함으로써 수행될 수 있다. 상기 미생물 성장의 결정은 미생물 세포들, 집합체들 및/또는 집락들의 수 및/또는 크기를 결정하는 것과 연관될 수 있다. 이와 관련된 기술들은 알려져 있고 이용가능하다. 따라서, 상기 미생물 성장은 시간에 걸쳐서 시료 속에 있는 미생물들 및/또는 미생물 세포들 및/또는 집락들 및/또는 집합체들의 수 및/또는 양 및/또는 크기를 관찰함으로써 측정될 수 있다. 이는 직접적 또는 간접적으로 측정될 수 있다. 시료 속에서 미생물들의 수 또는 양은 혈구 계측, 유동 세포 분석법, 또는 자동 현미경에 의해 직접적으로 측정될 수 있다. 미생물들은 검출되기 전에 고정 및/또는 투과될 수 있다. 또는, 미생물들은 생체내 조건하에서 검출될 수 있다. 유동 세포 분석법을 사용하여 세균 세포들의 수를 셈으로써 항균제 감수성 검사를 하는 방법은 학술지에 기재되었다 (Broeren 외, 2013, Clin. Microbiol. Infect. 19, 286-291 참조). 다중 채널 유체 카세트에서 세균이 성장되어 자동 현미경으로 일일이 셈으로써 항균제 감수성 검사를 수행하는 방법이 학술지(Price 외, 2014, J. Microbiol. Met. 98, 50-58 및 Metzger 외, 2014, J. Microbiol. Met. 79, 160-165 참조)에 기재되었고,

ACCELERATE DIAGNOSTICS에 의한 방법이 기술되었다 (국제공개공보 WO 제2014/040088 A1호, 미국특허 제 2014/0278136 A1호 및 제8,460,887 B2호 참조). 상기 방법들에서는, 세균은 장비의 표면 상에 성장 및 고정 되고, 두 개 이상의 시점들에서 상기 표면을 이미지화 하여 각각의 세균 및/또는 집락의 생존력 및/또는 성장이 평가된다 (균락의 성장을 측정하는 것을 포함함). 상기 방법들은 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 다른 알려진 방법들은 학술지(Fredborg 외, J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2047-53 참조) 및 미국특허 제8780181호 (UNISENSOR에 관한 발명)에 기술되는데, 이들 참고 문헌들에 따르면, 명시야 현미경 기술을 사용하여 세균들을 포함한 용액에서 겹쳐져 쌓인 이미지들(대상 평면들)의 연속들을 얻어냄으로써 상기 용액 속에 있는 세균들을 이미지화하여, 시료 속에 존재하는 세균들의 수를 측정할 수 있다.

[0156] 미생물 성장을 관찰하기 위해 이미징 사용에 기반을 둔 상기 방법들 중 어느 방법이 사용될 수 있지만, 본 발명의 방법은 바람직하게는 개별 세포를 세는 방식 또는 개별 세포 또는 집락의 성장을 관찰하는 것에 의존하지는 않는다 (예를 들어, Accelerate Diagnostics Inc.의 방법에 따라 개별적 세포 또는 균락의 크기의 증가를 관찰하는 방식에 의존하지 않음). 따라서, 본 발명은 항균제 감수성 검사에 사용되는 배양 또는 시료를 이미지화하기 위해서 고정된 위치를 사용하는 것에 제한되지 않는다 (그리고, 바람직한 구체예들에서는 고정된 위치를 사용하는 것과는 연관되지 않음). 더 정확히 말하면, 본 발명은 바람직하게는 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양 또는 배양 시료에서의 세포의 벌크(bulk) 성장을 관찰하는데, 예를 들자면, 시야에서 벌크 세포들을 이미지화함으로써 미생물의 성장을 관찰한다. 시야에서 미생물 세포 물질(생물체량)의 양(예를 들어, 면적)은 이미징에 의해 결정될 수 있다. 상기 세포 및 미생물 생체량은 예를 들어 명시야 현미경 기술(예를 들어, 현미경, 카메라 등)에 의해 직접적으로 검출될 수 있거나 또는 상기 미생물 세포들은 검출을 위해 염색될 수 있는데, 예를 들어, 설정되거나 또는 요구되는 성장 기간 후에 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양 또는 배양 시료에 염료를 첨가함으로써 염색될 수 있다.

[0157] 추가의 특별한 구체예에서는, 상기 항균제 감수성 검사를 위한 배양 또는 배양 시료는 미생물 세포를 고정화하지 않고 직접적으로 이미지화 또는 시각화 할 수 있으며, 예를 들면, 이미징을 위해 검출 위치 또는 표면으로 세포를 위치하기 위해 전기 이동과 같은 힘을 가하지 않고 이미지화 할 수 있다.

[0158] 상기와 같은 이미징 방법들에서는, 당 기술 분야에서 잘 알려진 방법들 및 원리들에 따라 상기 이미지들로부터 미생물 성장 양에 대한 수치를 결정하기 위해 알고리즘들이 적용될 수 있다. 따라서, 상기 이미지들에서 미생물 세포 물질/생물체량의 수, 크기, 및/또는 면적에 기초하여 (예를 들어, 시야 또는 보여지는 이미지에서 모든 상기 미생물 세포 물질의 양, 예를 들어, 이미지화된 전체 세포 물질), 통계적인 방법들이 상기 미생물 세포들의 이미지들에 적용될 수 있다. 상기 배양에 존재하는 미생물 및 항균제의 종류에 기초하여, 서로 다른 성장 패턴 및/또는 형태를 고려하기 위해 알고리즘들이 작성될 수 있다.

[0159] 상기 세는 방법 또는 이미징 방법으로 상기 항균제 감수성 검사에서 미생물의 표현형을 디지털 방식으로 분석할 수 있다. 이러한 디지털 표현형 결정으로 참조 기법(예를 들어, 미량액체배지 희석법)의 값과 유사한 최소 억제 농도 값이 산출되어 이로부터 데이터가 얻어진다.

[0160] 상기 방법들을 사용하여 얻을 수 있는 특별한 이점은 미생물의 농도 또는 양을 폭 넓은 범위로 포함하는 시료들을 대상으로 항균제 감수성 검사를 수행할 수 있다는 것과, 상기 항균제 감수성 검사를 수행하기 전에 표준화된 미생물 적정 농도를 사용할 필요가 없다는 것이다. 본 발명의 유용한 특징은 다른 농도의 미생물들에 대해 적용될 수 있다는 것이다. 적어도  $10^3$  CFU/ml의 미생물을 포함하는 시료가 본 발명의 방법의 시료로 사용될 것이며, 예를 들어, 적어도  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  또는  $10^8$  CFU/ml 농도의 미생물을 가지는 시료들이 사용될 것이다. 또는,  $10^3$  CFU/ml 미만을 포함하는 시료가 사용될 수 있을 것이며, 예를 들어, 적어도  $10^2$  CFU/ml을 포함하는 시료가 사용될 수 있다.  $10^2$  CFU/ml 미만을 포함하는 시료 또한 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0161] 본 발명의 일 구체예에서, 시료에 있는 미생물들의 수 또는 양을 결정하기 전에 미생물들을 염색하는 표지(즉, 착색제 또는 염료)를 첨가하거나 또는 미생물들의 본질적 특성을 활용하는 방법들을 사용해 미생물들을 검출할 수 있는데, 상기 방법으로는 예를 들어 위상 콘트라스트(phase contrast) 또는 당 기술 분야에서 알려진 시료 속에 있는 세균 수를 정량하는 어느 다른 방법을 들 수 있다. 미생물을 시각화하기 위한 수단으로 적합한 착색제들로는 유색 또는 형광 염료들을 포함하며, 예를 들어, 상기 염료를 펩티도글리칸 또는 DNA 염색하는 그람 염색법 또는 다른 염색법에 사용할 수 있다. 본 발명의 특별한 일 구체예에서, 미생물 내에 있는 DNA는 Vybrant® DyeCycle™이 사용되어 염색될 수 있다. 다른 DNA 착색제들은 잘 알려져 있고 구입 가능하다. 당 기술 분야에서



이용 가능한 세균을 염색하는 착색제들의 수는 방대하고 상당수의 착색들이 문서(표준 참조 문서들을 포함)에 기술되었으며 구입이 가능하다 (예를 들어, LIFE TECHNOLOGIES로 부터). 염색에 의한 미생물의 직접적인 표지화는 수행하기 쉽고, 편리하고 비용 효율적이며, 이에 대표적인 바람직한 구체예가 된다.

[0162] 따라서, 예를 들자면, 항균제 감수성 검사를 위해 미생물들이 미량정량 평판의 구멍들에서 배양되고, 배양 과정 중 미생물 성장 기간의 말미에 염료 또는 착색제를 첨가한 후 상기 평판의 구멍들은 이미지화 되며, 그 후 미생물 세포들, 집합체들 또는 집락들의 수 및/또는 크기를 결정함으로써 (예를 들어, 수를 세거나 또는 이미징을 통해서) 미생물들의 수 또는 양이 평가될 수 있다. 또는, 예를 들어, 미국특허출원 제61/979319호에 기술된 바와 같이, 유세포분석기 또는 유사한 유형의 기구(예를 들어, AQUILA 400(Q-LINEA AB, 스웨덴))를 사용하여 미생물 세포들을 일일이 셸으로써 이들의 수를 측정할 수 있다.

[0163] 또 다른 구체예에서, 미생물 내에 또는 상에 있는 생물학적 특성을 통해 표지를 특이적으로 부착시킬 수 있다. 용어 "생물학적 특성"은 예를 들어 미생물 안에 또는 상에 있는 분자(예를 들어, 세포 표면에 발현 또는 위치하는 단백질 또는 다른 생체분자) 일 수 있다. 예를 들어, 표지(예를 들어, 유색 또는 형광 표지)는 특정한 생물학적 특성에 특이적으로 결합하고 있는 단백질 또는 다른 친화성 결합 분자에 연결될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 단백질은 렉틴, 애플리바딘 또는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 이런 방식으로 표지화된 미생물들은 예를 들어 상기 기술된 바와 같이 일일이 셸으로써 검출될 수 있다.

[0164] 추가의 구체예에서, 근접 탐침들은 미생물 내에 또는 상에서의 특이적인 생물학적 특성을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0165] 본 발명의 추가의 또 다른 구체예에서, 상기 기술된 상기 자물쇠 탐침 및 회전환 증폭-기반 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD)(상기 분자 검사들에서 사용되는) 방법들을 사용하여 미생물들을 검출 및 일일이 셸 수 있다. 상기 방법들로 단일 미생물 세포를 검출 및 셸 수 있다. 따라서, 미생물은 상기 자물쇠 탐침의 결합에 의해 검출될 수 있고, 시료에서 미생물의 수는 상기 원형화된 자물쇠 탐침의 회전환 증폭을 통해 발생하는 증폭된 신호를 검출함으로써 간접적으로 측정될 수 있다. 각각의 회전환 증폭 산물(방울)은 단일의 미생물을 나타낼 것이다. 미생물들은 용해되고, 상기 미생물들의 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열들에 혼성화 하도록 제작된 자물쇠 탐침들이 사용될 수 있다. 이는 상기 기술된 바와 같이 DNA를 분리하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 기술된 바와 같이 바람직하게는 미생물 DNA를 선별적으로 분리하고 이에 대해 농축하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 항균제 감수성 검사에서의 배양은 일반적으로 초기 임상 시료 배양 단계에서 보다 덜 복잡하기 때문에, 미생물 DNA를 분리 또는 농축하는데 있어 단순화된 프로토콜이 사용될 수 있는데, 예를 들어 미생물들을 분리하는 여과 및 미생물 세포 용해 또는 단순히 직접적인 미생물 세포 용해와 연관된다.

[0166] 또는, 미생물 상에 또는 용해된 미생물 내에 존재하는 하나 이상의 분자들에 결합하는 상기 친화성 결합 분자들은 사용될 수 있으며, 상기 친화성 탐침은 자물쇠 탐침이 혼성화할 수 있는 핵산 표지 또는 꼬리표와 함께 제공되는데, 즉, 이는 면역회전환 증폭 검출 절차와 유사하다. 유사하게 상기 근접 탐침들은 미생물 내에 또는 상에 있는 표적에 결합하는데 사용될 수 있고, 상기 근접 탐침들의 핵산 영역들은 자물쇠 탐침의 결합에 주형으로 사용될 수 있고 선택적으로는 또한 회전환 증폭에 의해 자물쇠 탐침의 증폭이 일어날 수 있도록 한다. 이에 대한 절차는 널리 알려져 있고 문헌에 기술된다. 상기와 같이 상기 서클-투-서클 증폭은 신호 증폭을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 상기 시료 내의 '방울들'에서 기술된 바와 같이 예를 들어 형광으로 표지화 될 수 있는 방울들의 수를 셸함으로써 시료에서 미생물들의 수를 추정할 수 있다. 따라서, 이는 디지털 방식으로 표현형을 분석하여 감수성에 대해 판독하는 또 다른 편리한 수단을 제공한다.

[0167] 일반적으로 순수한 검사 조건 하에서 (즉, 단일 미생물이 있는 조건) 미생물 배양에 대해 항균제 감수성 검사를 수행하는 것이 유리하다. 따라서, 바람직한 일 구체예에서, (e) 단계의 핵산 검사에서 단일 미생물이 동정되는 경우 (f) 단계에서 상기 항균제 감수성 검사가 수행된다. 즉, 임상 시료에 오직 단일 미생물이 있는 것으로 판명되었을 경우 (f) 단계의 항균제 감수성 검사가 수행된다. 이는 오직 순수 배양이 상기 항균제 감수성 검사에 사용될 수 있도록 하게 한다. 따라서, 일부 구체예들에서, 두 가지 이상의 미생물들이 동정될 경우, (f) 단계의 상기 항균제 감수성 검사는 수행되지 않고 (g) 단계로 넘어가게 된다. 하지만, 이는 필수적인 특징은 이니고, 상기 항균제 감수성 검사를 수행하기 위해 시각화 또는 이미징에 기반한 미생물 검출 방법들을 사용할 수도 있으며, 그 예로서, 용액 속이 아니라 표면에 있는 세균을 이미지화하여 사용하는 ACCELERATE DIAGNOSTICS에 의해 제공되는 방법들 또는 유체 시스템에서 표지화된 미생물들을 검출하는 방법들(예를 들어, 상기 기술된 자동 현미경 유체 카세트-기반 시스템(Price 외, 2014, J. Microbiol. Met. 98, 50-58 및 Metzger 외, 2014, J. Microbiol. Met. 79, 160-165 참조))이 있다. 어느 세포에 의한 세포(cell-by-cell) 검출 및 동정 방법들은 한

종류 이상의 미생물을 포함한 시료들에 대한 항균제 감수성 검사를 위해 사용될 것이다.

- [0168] 편리하게는 본 발명의 방법은 자동화될 수 있다. 본 발명의 상기 단계들 중 하나 이상의 단계가 자동화될 수 있으며, 바람직하게는 (a)에서 (f) 단계들 중 어느 단계 또는 모든 단계가 자동화될 수 있다. 상기 기술된 다양하고 특이적 또는 바람직한 단계들은 자동화될 수 있는데, 분자 검사 및/또는 항균제 감수성 검사를 위한 바람직한 상기 자물쇠 탐침 기반 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD) 방법 및 미생물 및 균락을 세는 방법들을 그 예로 들 수 있다. 자동으로 세는 방법들은 이미 개발되었는데, 이러한 방법들은 혈액 배양 방법들에서 미생물 동정 및/또는 항균제 감수성 검사를 위해 사용되고, 본 발명에 따라 사용되거나 또는 사용을 위해 맞추어질 수 있다. 자동화는 임상 연구실 설정 및 특히 패혈증의 진단에 중요한 복합적인 능력뿐만 아니라 빠른 속도 및 쉬운 작동과 같은 이점을 제공할 것이다.
- [0169] 추가적인 양태에서 보면, 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치를 제공하며, 상기 장치는:
- [0170] 배지를 함유하고 임상 시료를 담을 수 있도록 배치된 첫 번째 배양용기;
- [0171] 선택적으로 배지를 함유한 두 번째 배양용기; 및
- [0172] 선택적으로 상기 첫 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하여 상기 두 번째 배양용기로 옮기는 역할을 하는 일부 제거 장치를 포함하는 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치에 관한 것으로,
- [0173] 상기 첫 번째 배양용기는 상기 임상 시료의 배양을 위한 것이고; 그리고
- [0174] 상기 두 번째 배양용기는 상기 첫 번째 배양용기의 내용물 일부로서 임상 시료와 배지로 이루어진 혼합물 또는 배양된 임상 시료를 받아들일 수 있도록, 그리고 상기 일부를 배양할 수 있도록 배치된 것을 특징으로 하고,
- [0175] 검사용 부분 표본으로 사용되는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하는데 사용되는 검사용 부분 표본 추출 장치; 및
- [0176] 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고, 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는데 사용되는 DNA 검사 장치;를 더 포함하고,
- [0177] 상기 DNA 검사 장치는 i. 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
- [0178] ii. 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 이용하여 상기 핵산 검사를 수행하기 위해서 배치되는 것을 특징으로 하고;
- [0179] 상기 DNA 검사 장치 사용을 통해서 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화 되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 증폭 반응에 참여했는지 여부가 확인되는 것을 특징으로 하며;
- [0180] 상기 미생물 검출 장치는, 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정될 경우, 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 배양된 임상 시료 및/또는 배양된 일부는 항균제 감수성 검사 장치로 옮겨진 다음, 이들에 대해서 성장 또는 성장에 대한 표지들을 평가하여 미생물 성장을 관찰하는 항균제 감수성 검사가 수행되고, 상기 항균제 감수성 검사에 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 상기 DNA 검사 장치에 의해 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되도록 배치되고; 그리고 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 이의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 추가 배양 후에 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 및/또는 상기 배양된 일부를 더 배양하도록 배치되는 것;을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치이다.
- [0181] 추가적인 양태에서 보면, 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치를 제공하며, 상기 장치는:



- [0182] 배지를 함유하고 임상 시료를 담을 수 있도록 배치된 배양용기;
- [0183] 검사용 부분 표본으로 사용되는 상기 배양용기의 내용물 일부를 채취하는데 사용되는 검사용 부분 표본 추출 장치; 및
- [0184] 상기 배양용기는 상기 검사용 부분 표본의 추출 후에 상기 임상 시료를 배양하기 위한 것이고, 그리고 선택적으로 상기 검사용 부분 표본의 추출 전에 상기 임상 시료를 배양하기 위한 것임을 특징으로 하고,
- [0185] 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고, 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는데 사용되는 DNA 검사 장치;를 포함하고,
- [0186] 상기 DNA 검사 장치는 i. 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
- [0187] ii. 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 이용하여 상기 핵산 검사를 수행하기 위해서 배치되고;
- [0188] 상기 DNA 검사 장치 사용을 통해서 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 증폭 반응에 참여했는지 여부가 확인되는 것을 특징으로 하고; 그리고
- [0189] 상기 미생물 검출 장치는, 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정될 경우, 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 상기 배양용기에서 배양된 임상 시료는 항균제 감수성 검사 장치로 옮겨진 다음, 이에 대해서 성장 또는 성장에 대한 표지들을 평가하여 미생물 성장을 관찰하는 항균제 감수성 검사가 수행되고, 상기 항균제 감수성 검사에 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 상기 DNA 검사 장치에 의해 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되도록 배치되고; 그리고 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 이의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 추가 배양 후에 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 상기 배양용기에서 상기 임상 시료를 더 배양하도록 배치되는 것;을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치이다.
- [0190] 추가적인 양태에서 보면, 본 발명은 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치를 제공하며, 상기 장치는 배지를 함유하고 임상 시료를 담을 수 있도록 배치된 첫 번째 배양용기;
- [0191] 배지를 함유한 두 번째 배양용기; 및
- [0192] 첫 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하여 두 번째 배양용기로 옮기는 역할을 하는 일부분 제거 장치;를 포함하는 것을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치에 관한 것으로,
- [0193] 상기 첫 번째 배양용기는 상기 임상 시료의 배양을 위한 것이고; 그리고
- [0194] 상기 두 번째 배양용기는 상기 첫 번째 배양용기의 내용물 일부로서 임상 시료와 배지로 이루어진 혼합물 또는 배양된 임상 시료를 받아들일 수 있도록, 그리고 상기 일부를 배양할 수 있도록 배치된 것;을 특징으로 하고,
- [0195] 검사용 부분 표본으로 사용되는 상기 두 번째 배양용기의 내용물 일부를 채취하는데 사용되는 검사용 부분 표본 추출 장치; 및
- [0196] 상기 검사용 부분 표본으로부터 DNA를 분리하고, 미생물을 동정하고 상기 미생물에서 하나 이상의 유전적 항균제 내성 표지들의 유무를 확인하기 위해 상기 DNA를 대상으로 핵산 검사를 수행하는데 사용되는 DNA 검사 장치;를 더 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0197] 상기 DNA 검사 장치는 i. 하나 이상의 미생물 동정용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 특정 미생물 존재 유무를 확인할 수 있도록 하는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선택적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머; 및
- [0198] ii. 하나 이상의 항균제 내성 표지 검출용 핵산 탐침들 또는 프라이머들, 즉, 유전적 항균제 내성 표지에 해당되는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화할 수 있는 상기 탐침 또는 상기 프라이머, 또는 상기 뉴클레오타이드 서열을 선별적으로 증폭할 수 있는 상기 프라이머;를 이용하여 상기 핵산 검사를 수행하기 위해서 배치되고; 그리고

- [0199] 상기 DNA 검사 장치 사용을 통해서 상기 탐침들 또는 상기 프라이머들이 상기 DNA에 혼성화 되었는지 여부 및/또는 상기 프라이머들이 증폭 반응에 참여했는지 여부가 확인되는 것을 특징으로 하고; 그리고
- [0200] 상기 미생물 검출 장치는, 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정될 경우, 상기 검사용 부분 표본의 추출 후 상기 두 번째 배양용기에서 배양된 일부는 항균제 감수성 검사 장치로 옮겨진 다음, 이에 대해서 성장 또는 성장에 대한 표지들을 평가하여 미생물 성장을 관찰하는 항균제 감수성 검사가 수행되고, 상기 항균제 감수성 검사에 사용되는 항균제들의 유형 및 농도는 상기 DNA 검사 장치에 의해 검출된 미생물 및 항균제 내성 표지들에 따라 결정되도록 배치되고; 그리고 상기 DNA 검사 장치에 의해 특정 미생물이 동정되지 않을 경우, 미생물을 동정하고 이의 항균제 내성 프로파일을 결정하기 위해 추가 배양 후에 수행되는 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사를 위해 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 및/또는 상기 배양된 일부를 더 배양하도록 배치되는 것;을 특징으로 하는 임상 시료에서 미생물 검출 및 특성 규명을 위한 미생물 검출 장치이다.
- [0201] 상기 앞서 기술한 세 가지 양태들의 각각에서, 상기 미생물 검출 장치는 상기 방법의 단계들 및 상기 설정된 바람직한/선택적인 단계들 중 어느 단계 또는 모든 단계를 수행하기 위해 배치될 수 있다. 따라서, 상기 DNA 검사 장치는 상기 기술된 DNA 검사 단계들 중 어느 또는 모두를 수행하기 위해서 배치될 수 있고, 상기 항균제 감수성 검사 장치는 상기 기술된 항균제 감수성 검사 단계들 중 어느 또는 모두를 수행하기 위해서 배치될 수 있다. 상기 기구는 시료에 존재하는 미생물 세포 물질(즉, 미생물 생체량)의 양을 결정하기 위한 수단을 포함할 수 있으며, 특히, 이는 직접적인 평가 또는 결정을 통해서 이루어질 수 있다. 이는 미생물 생체량의 양을 시각적으로, 특히 이미징을 사용하여 결정함으로써 이루어질 수 있다. 따라서, 상기 기구는 이차원 이미지들을 얻기 위해 이미징 수단(예를 들어, 현미경 및 선택적으로 카메라)을 포함할 수 있다. 상기 기구는 미생물 세포 물질의 양을 결정하기 위해 상기 이미지들을 처리하는 처리기를 포함할 수 있다. 상기 처리기는 상기 미생물 생체량의 면적(특히, 조사되는 영역의 시야에서(예를 들어, 이미지에서) 상기 미생물 생체량의 면적)을 결정하기 위해 설정될 수 있다.
- [0202] 더 일반적으로, 상기 이미징 수단 및 처리기는 미생물들 및/또는 미생물 집락들 또는 집합체들의 양 및/또는 수 및/또는 크기를 결정하기 위해서 설정될 수 있다. 이는 세포들 또는 집락들을 세는 것을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 미생물 세포들, 집락들 또는 집합체들의 크기, 면적, 모양, 형태 및/또는 수를 평가(또는 결정)함으로써 미생물 성장의 정도를 시각적으로 평가하는 어느 수단을 포함할 수 있으며, 여기서 용어 "집합체"는 물리적으로 근접한 세포들의 어느 더미(예를 들어, 무리 또는 클러스터(cluster))를 포함한다; 이는 클론 집락들(clonal colonies) 뿐만 아니라 집합체를 이루거나 서로 뭉친(예를 들어, 인접한 이웃 세포들과 집합체를 이룬) 세포들의 비-클론(non-clonal) 무리들/클러스터들을 포함할 수 있다. 미생물의 성장을 측정하는데 사용되는 매개 변수는 (f) 단계에서 사용되는 ((e) 단계에서 결정된) 미생물 및 항균제들의 종류에 따라 변할 수 있다(하지만 필요는 없지만). 사실상, 사용되는 유기체 및 항균제들에 따라, 세포들의 형태 또는 성장 패턴이 영향 받을 수 있으며, 즉, "정상" 또는 "전형적인" 형태 또는 성장 패턴으로부터 (예를 들어, 항균제가 없을 때 보여지는 형태 또는 성장 패턴으로부터) 변화되거나 또는 바뀔 수 있다. 일부 항균제 감수성 검사에서 성장 관찰 방법들은 이러한 변화들을 검출하는 것에 의존적일 수 있지만, 본 발명에 따르면 상기 변화들을 고려하는 것이 필수적이지 않고, 미생물 성장 또는 생물체량(즉, 면적)의 양은 형태 및/또는 성장 패턴과는 무관하게 결정될 수 있다. 따라서, 사용되는 미생물 세포 및/또는 항균제들과는 무관하게 동일한 성장 관찰 방법이 사용될 수 있다.
- [0203] 배지는 상기 장치의 작동 전에 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기(들)로 첨가될 수 있거나, 또는 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 배지로 채워진 상태로 제공될 수 있다. 일반적으로, 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 소모품일 것이다. 임상 시료는 상기 미생물 검출 장치 안에 장착되어 있는 상기 첫 번째 배양용기로 첨가되거나, 또는 상기 미생물 검출 장치로 상기 용기가 삽입되기 전에 상기 장치 밖에 있는 상기 용기로 첨가될 수 있다. 상기 첫 번째 배양용기는 상기 임상 시료를 수용할 수 있도록 배치될 수 있고, 이는 상기 배지가 상기 배양용기로 투입되기 전에 또는 투입된 후에 또는 투입과 동시에 행해질 수 있다. 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 관심의 임상 시료를 다루는데 적합한 유형의 어느 용기일 수 있다. 일 예에서는, 상기 임상 시료는 혈액 시료이다. 혈액 시료일 경우, 상기 혈액은 환자로부터 채취되어 상기 미생물 검출 장치 밖에 있는 상기 배양용기로 첨가되고, 그런 다음 상기 시료 및 배지를 포함하고 있는 상기 첫 번째 배양용기는 상기 미생물 검출 장치로 삽입될 수 있다. 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기에서 상기 임상 시료 또는 상기 배양물 일부는 상기 초기 검사 단계들에서처럼 기구의 동일한 부분에서 더 배양되거나, 대안으로 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 상기 미생물 검출 장치를 가지는 (이런 이유로 다수의 분리된 부분들을 포함하는) 분리된 기구로 옮겨질 수 있다. 후자의 경우, 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 추출되어 상기 분리된

기구로 옮겨지는 동안 상기 배양용기의 내용물은 또 다른 전용 기구에서 추가적으로 배양될 수 있는데, 이때 해당 환자를 치료하는 시설(예를 들어, 병원)에 이미 설치되어 있는 기구를 사용하는 것이 유리할 것이다. 따라서, 상기 첫 번째 및/또는 두 번째 배양용기는 계속 배양 되어질 수 있고, 이는 상기 진행 단계들에서와 같이 동일한 기구 내부 또는 밖에서 수행될 수 있거나, 상기 장치의 또 다른 분리된 부분 안에서 수행될 수 있다.

[0204] 본 발명은 하기의 도면들을 참고로 하여 아래의 실시예들에서 더 자세히 기술될 것이다.

[0205] 도 1A에서는 시료에서 미생물들의 검출을 위한 마이크로어레이(microarray) 판을 도시하고, 도 1B에서는 다양한 미생물들에서 발생하는 신호의 형광 강도를 도시한다. 도 1A 에서, 네 군데의 모서리 및 이미지의 좌측 중앙에 있는 반점들은 이미지 정렬을 위한 참고 반점들이다. 세 개의 더 밝은 반점들은 본 발명의 검출 방법을 사용하여 대장균에 특이적인 뉴클레오타이드 서열이 상기 시료에서 검출된 것을 지시한다. 도 1B는 대장균에 특이적인 탐침이 사용되었을 때 다양한 다른 미생물들로부터 발생된 신호를 보여 주고, 본 발명의 방법이 시료에서 특정 미생물(이 경우 대장균)의 존재를 검출할 수 있다는 것을 지시한다.

[0206] 도 2는 시프로플록사신 없이 배양된 양성 대조군에 대해, 다양한 다른 농도의 시프로플록사신이 보충된 물러-힌튼(Muller-Hinton, MH) 액체 배지(broth)에서 배양된 세균의 상대적인 성장을 도시한다. 세포들을 Vybrant® DyeCycle™ Orange 염료로 착색시킨 후 자동 현미경을 이용하여 세포들의 수를 세었다.

[0207] 도 3은 어느 항생제들 없이 배양된 양성 대조군 시료에 대해, 다수의 다른 항생제들로 보충된 물러-힌튼 액체 배지에서 배양된 세균의 상대적인 성장을 도시하며, 각 항생제들에 대해 다양한 다른 농도로 실험이 진행되었고 각각의 농도에 대한 상대적인 성장이 측정되었다 (A: 세포탁심, B: 시프로플록사신, C: 젠타마이신, D: 메로페넴, E: 세프트지딤, F: 피페라실린+타조박탐). 세포들을 Vybrant® DyeCycle™ Orange 염료로 착색시킨 후 AQUILA 400을 이용하여 세포들의 수를 세었다. 상기 데이터는 4 시간 이내에 차등 성장이 검출될 수 있음을 지시한다. 최소 억제 농도 값들은 상기 항생제들 각각에 대해서 4, 6 및 24 시간에서 및 다양한 기준치들에서 계산되었다.

[0208] 도 4A에서는 미생물의 항생제 감수성을 결정하기 위해 시료 내에서 세균을 검출하는 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD)의 수행을 위해 요구되는 실험 절차들에 대한 흐름을 도시하고, 도 4B에서는 항생제 없이 배양된 양성 대조군에 대해, 시프로플록사신 또는 세포탁심이 보충된 물러-힌튼 액체 배지에서 배양된 세균의 상대적인 차등 성장을 도시한다. 특정 미생물 DNA 서열의 존재를 지시하는 회전환 증폭 산물들이 증폭된 단일 분자 검출에 의해 검출되었고, AQUILA 400에 의해 회전환 증폭 산물의 수가 측정되었다. 그 결과는 도 4B에서 그래프로 도시된다.

[0209] 도 5는 특정 미생물 DNA 서열을 검출하기 위한 탐침 제작에 필요한 계획도를 도시한다. 비오틴이 부착된 포획 올리고뉴클레오타이드는 이와 상보적인 표적 DNA의 한 부분에 결합하고, 상기 표적 DNA를 고체 상에 고정시킨다. 두 개의 표적에 상보적인 부분들(5'- 및 3'-팔(arm)) 및 검출에 필요한 자리(DO-충칭적), 제한 효소 절단 및 프라이밍(priming) 자리(RO-충칭적), 어레이(array) 올리고 혼성화 자리(AO-유일한)로 이루어진 백본을 포함하는 자물쇠 탐침은 표적 DNA에 상보적인 상기 5' 및 3' 말단 서열들을 통해 표적 DNA에 결합하고, 회전환 증폭 증폭 및 서클-투-서클 증폭 반응이 일어나기 전에 원형으로 결합될 수 있다.

[0210] 실시예들.

[0211] 실시예 1. 혈액 배양 및 미생물 동정 및 분자 검사에 의한 특성 규명

[0212]  $10^3$  CFU/ml 농도가 되도록 500  $\mu$ l의 대장균 세균 현탁액으로 접종된 혈액을 격막으로 통해 주사 바늘로 혈액 배양 플라스크(Bact/ALERT FA Plus(Biomérieux))에 첨가했다. 전배양을 위해, Grant-Bio PTR-35(Grant Instruments Co., Ltd)를 이용해 자체적으로 제작한 다수 회전자를 혈액 배양 플라스크(blood culture flask, BCF)를 교반하는 용도로 사용했다. 시료들은 35 °C에서 4 시간동안 배양되었다.

[0213] 주사기를 사용하여 1 ml의 전혈에 상응하는 5 ml의 상기 시료를 채취했다.

[0214] 세균 DNA의 농축은 MOLZYM(독일) 제조사에서 제공하는 방법에 따라 원심 분리 없이 수행되었다.

[0215] 세포 용해 완충용액을 제조

[0216] 800  $\mu$ l ES를 160  $\mu$ l DNA 분해효소에 첨가하고 피펫팅(pipetting)을 6회 하여 섞은 후 모든 상기 DNA 분해효소 용액을 12,800  $\mu$ l 완충용액에 첨가 한 뒤 바로 피펫팅을 6회 하여 혼합함으로써 세포 용해 완충용액을 제조함.

- [0217] 단백질 분해효소(proteinase) K 준비
- [0218] 1000  $\mu$ l ES를 400  $\mu$ l 단백질 분해효소 K에 첨가 후 피펫팅 6회로 섞어 단백질 분해효소 K를 준비함.
- [0219] 세포 용해
- [0220] 상기 혈액 배양 플라스크로부터 채취한 시료 5 ml에 4300  $\mu$ l의 세포 용해-DNA 분해효소 완충용액을 첨가하고 8회 피펫팅으로 혼합 후 45  $^{\circ}$ C에서 10 분간 항온 처리함.
- [0221] 상기 DNA 분해효소를 비활성화시키고 단백질 분해효소 K 350  $\mu$ l를 상기 용해물에 첨가하고 8회 피펫팅으로 혼합한 후 45  $^{\circ}$ C에서 10 분간 항온 처리함.
- [0222] 컬럼에 시료를 포획하고 세척하는 절차를 3번 반복함
- [0223] 여과 컬럼(MOLZYM, 독일)에 상기 용해물 605  $\mu$ l를 첨가하고, 15 초간 진공을 가한다. 상기 여과 컬럼에 500  $\mu$ l의 RS를 첨가 후 15 초간 진공을 가한다. 상기 여과 컬럼에 또 다른 상기 용해물 605  $\mu$ l를 첨가하고, 30 초간 진공을 가한다. 상기 여과 컬럼에 500  $\mu$ l의 RS를 첨가 후 15 초간 진공을 가한다. 상기 여과 컬럼에 또 다른 상기 용해물 605  $\mu$ l를 첨가하고, 45 초간 진공을 가한다. 상기 여과 컬럼에 500  $\mu$ l의 RS를 첨가 후 15 초간 진공을 가한다. 연속하여 모든 시료가 첨가될 때까지 남은 시료를 첨가 후 45초간 진공을 가한다. 요구될 시(예를 들어, 여과하는 동안 상기 필터가 막힐 경우), 상기 용해물을 여과하기 위해 하나 이상의 필터(filter)가 사용될 수 있다.
- [0224] 미생물 용해를 위한 세포 용해 완충용액의 제조
- [0225] 베타-메르캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol) 5.6  $\mu$ l를 600  $\mu$ l의 RL에 첨가하고 6회 피펫팅 후, 모든 베타-메르캅토에탄올- RL 혼합 용액을 80  $\mu$ l의 버그세포용해완충액(BugLysis)에 첨가하고 6회 피펫팅하여 섞어줌.
- [0226] 미생물들 용해
- [0227] 상기 제조된 세포 용해 혼합물 170  $\mu$ l를 상기 컬럼에 첨가하고 200 밀리초(milliseconds, ms) 동안 진공을 가함. 45  $^{\circ}$ C에서 10 분간 항온 처리함. 상기 제조된 단백질 분해효소 K 용액 280  $\mu$ l를 520  $\mu$ l의 완충용액 RP에 첨가함. 6회 피펫팅으로 섞어줌. 단백질 분해효소 K 용액-RP 혼합 용액 200  $\mu$ l를 상기 컬럼에 첨가함. 200 밀리초 동안 진공을 가함. 45  $^{\circ}$ C에서 10 분간 항온 처리함.
- [0228] 컬럼에 미생물 DNA를 결합시키기
- [0229] 상기 컬럼을 상온으로 맞추어진 블록(block)으로 이동시킴. 2 분간 기다리기. CSAB 500  $\mu$ l를 상기 컬럼에 첨가 후, 2초간 진공 가함.
- [0230] 세척 1
- [0231] 상기 컬럼에 WB 500  $\mu$ l 첨가 후, 2 초간 진공 가함.
- [0232] 세척 2
- [0233] 상기 컬럼에 WS 500  $\mu$ l 첨가 후, 2 초간 진공 가함.
- [0234] 컬럼 막(membrane) 건조시키기.
- [0235] 10 분간 진공 가함.
- [0236] 용출
- [0237] 상기 컬럼에 ET 200  $\mu$ l 첨가함.
- [0238] 200 밀리초 동안 진공 가함.
- [0239] 적어도 5 분간 상온에서 항온 처리함.
- [0240] 1 분간 진공 가함.
- [0241] 두 개의 용출들을 얻기 위해 한 번 반복함.
- [0242] 상기 분자 검사는 Goransson 외, 2012(상기 기술된)의 방법에 따라 상기 농축된 세균 DNA 시료에 대해 수행되었다. 세균의 분자 동정 과정 동안 남은 혈액 시료는 교반기에 유지되었다.



- [0243] 자물쇠 탐침들 및 표적 포획 탐침들은 INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES(뮌헨, 독일)로부터 구매했다. 상기 탐침들은 생물정보학을 활용하여 선별되었고, 각각의 세균에 있는 유일한 모티프(motif)를 검출할 수 있도록 제작되었다. 표적 DNA에 상기 포획 탐침들의 혼성화 및 상기 자물쇠 탐침들의 결합은 동시에 수행되었는데, 단편화되고 및 변성된 게놈 DNA를 20 mM 트리스-염화수소(pH 8.3), 25 mM 염화칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 0.5 mM 엔에디(NAD), 0.01% 트리톤 X-100(Triton® X-100), 100 nM 자물쇠 탐침, 50 nM 포획 탐침, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민(NEW ENGLAND BIOLABS, 매사추세츠, 미국), 및 250 mU/ $\mu\text{l}$  앰플리가제(ampligase)(EPICENTRE BIOTECHNOLOGIES, 위스콘신, 미국)를 포함하는 용액에 첨가 후 55 °C에서 5 분간 항온 처리함으로써 수행되었다. 반응된 상기 자물쇠 탐침들과 함께 상기 표적 DNA는 비오틴이 부착된 포획 탐침들을 통해 자성을 띤 입자들에 포획되었다. 이는 50  $\mu\text{g}$ 의 다이아비드즈 MyOne™ 스트렙타아비딘 T1 비드즈(Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 beads)(INVITROGEN)를 상기 혼성화/결합 반응에 첨가하고 상기 시료를 상온에서 3 분간 항온 처리함으로써 수행되었다. 과량의 탐침들은 5 mM 트리스-염화수소(pH 7.5), 5 mM 이디티에이(EDTA), 1 M 염화나트륨, 및 0.1% 트윈-20(TWEEN-20)을 포함한 세척 완충용액 100  $\mu\text{l}$ 로 한 번 세척하여 제거되었다. 이어지는 회전환 증폭 반응을 방해할 수 있기 때문에 과량의 선형 자물쇠 탐침들이 제거 되었다.
- [0244] 반응된 탐침들은 회전환 증폭과 함께 시작되는 연속적인 효소 반응들을 포함하는 서클-투-서클 증폭에 의해 증폭되었다. 상기 회전환 증폭 반응은 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액(FERMENTAS, 리투아니아; 33 mM 트리스 아세테이트(37 °C에서 pH 7.9), 10 mM 마그네슘-아세테이트, 66 mM 칼륨-아세테이트, 0.1%(v/v) 트윈-20(TWEEN-20), 1 mM 디티티(DTT)), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 25 nM 프라이머, 및 100 mU/ $\mu\text{l}$  파이29(phi29) DNA 중합효소를 포함하는 결합 혼합물 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 시작되었다. 상기 반응은 37 °C에서 11 분간 항온 처리되었고, 1분간 65 °C에서 열처리되어 비활성화 되었다. 상기 회전환 증폭 산물들은 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 3 유닛(units)의 AluI 제한효소(NEW ENGLAND BIOLABS), 600 nM 복제 올리고뉴클레오타이드, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민을 첨가하여 37 °C에서 1 분간 절단 되었고, 1분간 65 °C 열처리로 상기 반응은 종결되었다. 결합, 증폭 및 표지화 반응들은 최종 부피가 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 1.36 mM 에이티피(ATP), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 28 mU/ $\mu\text{l}$  T4 DNA 연결효소 및 120 mU/ $\mu\text{l}$  파이29(phi29) DNA 중합효소를 포함한 혼합물을 첨가함으로써 수행되었다. 상기 반응들은 7 분간 37 °C에서 항온 처리되었고, 1 분간 65 °C 열처리로 종료되었다. 상기 과정은 한 번 반복되었다. 최종 회전환 증폭 후에, 상기 산물들은 한 번 더 단량체들로 절단되었다. 이로써 상기 회전환 증폭 산물들은 분석될 준비가 된다.
- [0245] 상기 절단된 시료는 마이크로어레이로 옮겨져서, 30 분간 55 °C에서 항온 처리된 후 상온에서 1xSSC 완충용액으로 세척되었다. 다음으로, 상기 혼성화된 회전환 증폭 단량체들은 10 nM 농도의 검출 올리고뉴클레오타이드가 포함된 2 x SSC에서 30 분 동안 55 °C에서 혼성화를 통해 표지화된 후 상온에서 1xSSC로 두 번 세척되고 회전건조되었다.
- [0246] 그 다음, 상기 어레이는 어레이 스캐너에서 스캔되고 이에 얻어진 결과는 어레이 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 하기와 같이 분석되었다.
- [0247] 상기 어레이 이미지는 하나 또는 여러 병원균들에 해당되는 반점들을 검출하기 위해서 평가된다. 밝은 반점은 검출된 병원균에 해당되며, 병원균 당 세 개의 중복된 반점들이 나타난다. 추가로, 상기 어레이는 이미지 정렬을 위해 사용되는 참고 반점들을 가지며, 상기 참고 반점들은 항상 밝게 빛이 나는데, 프로토콜 참고 반점들이 발광하면 진행된 실험의 개별적인 단계가 성공적으로 수행되었다는 것이 지시하는 것이다. 상기 분석은 하기 단계들로 나뉜다:
- [0248] 1. 상기 참고 반점들은 검출되고 상기 이미지는 그에 따라 조정되어진다.
- [0249] 2. 상기 반점의 강도 및 백그라운드가 측정되고, 상기 백그라운드 보정된 값이 계산된다.
- [0250] 3. 상기 측정된 강도는 병원균 특이적 백그라운드에 대해 보정된다. 예를 들어, 다른 병원균들에 해당되는 탐침 세트들의 비특이적인 DNA 결합으로 발생하는 백그라운드 신호에 대해 보정된다.
- [0251] 4. 상기 어레이 강도 데이터는 병원균 동정 및 품질 값에 대한 답을 제공하기 위해서 사용된다.
- [0252] a. 미생물 동정에 대한 답을 계산할 때 알고리즘은 특정 병원균에 해당되는 모든 복제 반점들의 강도 값을 고려한다.
- [0253] b. 상기 미생물 동정에 대한 답은 질적(병원균의 존재를 보고하는), 및/또는 정량적(상기 시료에 존재하는 병원

균의 양을 나타내는 신호를 보고하는)일 수 있다.

- [0254] c. 상기 프로토콜 참고 반점들은 상기 분자 프로토콜이 성공적으로 수행되었음을 확인하기 위해서 평가된다.
- [0255] 5. 상기 결과는 수집되어 이어지는 항균제 감수성 검사 분석으로 전달 및/또는 결과 보고서에 보고될 수 있으며, 상기 결과는 하기를 포함한다:
- [0256] a. 상기 검출된 병원균(들)의 동정
- [0257] b. 검출된 각 병원균에 대한 준-정량적(semi-quantitative) 값
- [0258] c. 상기 분자 프로토콜의 성공률을 지시하는 품질 값
- [0259] 시료 어레이 이미지는 도 1A에 도시된다. 평판의 모서리를 따라 있는 5 개의 반점들은 참고 반점들이고, 이들은 이미지 정렬을 위해 사용된다. 더 밝은 반점들은 검출된 병원균(대장균)을 지시한다. 도 1B는 형광 신호가 대장균에 대해 특이적으로 발생되었음을 보여준다.
- [0260] 실시예 2. 실시예 1의 혈액 배양에 대한 항생제 감수성 검사
- [0261] 상기 분자 검사가 실시되는 동안 계속 배양되어져 온 상기 혈액 배양 플라스크에서 남아 있는 시료 5 ml을 채취하였다.
- [0262] 상기 채취된 시료에서 세균을 농축하면서, 동시에 배지를 갈아 주었다 (이 경우에는 물러-힌튼 배지(Mueller-Hinton media, MH-media)를 사용함). 대장균 세균은 0.2  $\mu$ m 필터를 사용해 여과되어 회수되었고, 그 다음 상기 회수된 세균은 물러-힌튼 배지에 부유되었다. 상기 세균 현탁액에서 63  $\mu$ l씩의 부분 표본들을 덜어 미세정량 평판의 선별된 각 구멍에 넣었다.
- [0263] 각 구멍은 각기 다른 항생제들을 포함할 뿐만 아니라, 이때 각 항생제는 다양한 농도로 각각의 구멍에 첨가되었다. 실시예 1에서 동정된 미생물이 이 경우 대장균이기 때문에, 이에 맞추어 하기에 나열되는 항생제들이 항균제 감수성 검사를 위해 선별되었다: 시프로플록사신, 피페라실린+타조박탐, 세프트락심, 세프트라지딘, 메로페넴 및 젠타마이신. 알려진 임상적 최소 억제 농도 값들을 기반으로 각 항생제에 대해 6 개의 다른 농도 시리즈가 준비되었다. 물러-힌튼 액체 배지를 포함하고 항생제가 없는 7 번째 구멍이 양성 대조군으로 사용되었다. 상기 미세정량 평판은 판독되기 전에 4 시간 동안 35  $^{\circ}$ C에서 항온 처리되었다. 7 $\mu$ l의 10 $\mu$ M Vybrant<sup>®</sup> DyeCycle<sup>™</sup> Orange 염료(MOLECULAR PROBES<sup>®</sup> LIFE TECHNOLOGIES)가 각 구멍에 첨가되고, 30 분간 37  $^{\circ}$ C에서 항온 처리되었다. 미세정량 평판의 각 구멍은 이미지화 되고, 세균 수가 측정되었다. 상기 양성 대조군에 대해 상대적인 차등 성장은 세균에 대한 최소 억제 농도 값을 결정하는데 사용되었다. 시프로플록사신에 대한 결과는 도 2에 도시된다.
- [0264] 실시예 3. 유동 세포 분석법 타입 기구(AQUILA 400, Q-LINEA AB, 스웨덴)를 사용하여 각각의 세균을 세는 방법을 이용한 항생제 감수성 검사 프로파일의 결정
- [0265] 실시예 1과 같이 세균은 혈액 배양에서 배양되었다. 상기 분자 검사가 실시되는 동안 계속 배양되어져 온 상기 혈액 배양 플라스크에서 남아 있는 시료 5 ml을 채취하였다. 상기 채취된 시료에서 세균을 농축하면서, 동시에 배지를 갈아 주었다 (이 경우에는 물러-힌튼 배지를 사용함). 대장균 세균은 0.2  $\mu$ m 필터를 사용해 여과되어 회수되었고, 그 다음 상기 회수된 세균은 물러-힌튼 배지에 부유되었는데, 이때 물러-힌튼 액체 배지에 약  $10^6$  CFU/ml로 희석되기 전에 물러-힌튼 액체 배지에 약  $10^8$  CFU/ml의 농도가 되도록 부유되었다.
- [0266] 항생제 용액들은 10개의 검사 농도들로 물러-힌튼 액체 배지에 2:1 연속 희석들의 시리즈로 준비되었다. 세균 및 항생제의 종류에 근거하여 항생제 농도 범위가 선택되었다. 실시예 1에서 동정된 미생물이 이 경우 대장균이기 때문에, 이에 맞추어 하기에 나열되는 항생제들이 항균제 감수성 검사를 위해 선별되었다: 시프로플록사신, 피페라실린+타조박탐, 세프트락심, 세프트라지딘, 메로페넴 및 젠타마이신. 알려진 임상적 최소 억제 농도 값들을 기반으로 8 개의 다른 농도 시리즈가 선별되었다. 8 가지의 다른 농도로 하여 항생제 용액을 100  $\mu$ l 포함하는 8 개의 시료 튜브들 및 800  $\mu$ l 물러-힌튼 액체 배지가 준비되었다. 900  $\mu$ l 물러-힌튼 액체 배지를 포함하고 항생제는 포함하지 않는 하나의 튜브를 추가로 준비하여 양성 대조군으로 사용했다. 세균 현탁액 ( $10^6$  CFU/ml) 100  $\mu$ l를 모든 9 개의 튜브들에 첨가했다. 세균을 포함하지 않고 1000  $\mu$ l의 물러-힌튼 액체 배지만을 포함하는 음성 대조군 시료를 준비하였다.
- [0267] 모든 튜브들은 35  $^{\circ}$ C에서 배양되었고, 시료들은 0, 4, 6 및 24 시간 후에 채취되었다. 실시예 2에서처럼 세포수를 계수하기 위해 세균 시료들이 준비되었다. AQUILA 400 기구(Q-LINEA AB, 스웨덴)에서 각각의 세균을 세는

것을 기반으로 하는 유동 세포 분석법을 사용하여 세균 항균제 감수성 검사 프로파일이 결정되었다. AQUILA 400 분석은 알렉사(Alexa) 488 레이저를 사용하여 수행되었다.

[0268] 다른 시점들에서 수행된 상기 분석 결과를 근거로, 다른 농도의 항생제들에서 세균의 차등 성장을 검출하고, 이에 따라 항생제 감수성을 결정하는데 4 시간이면 충분하다는 것을 확인할 수 있었다. 더 짧은 시간의 경우도 기존의 문헌에 기술된 바 있기 때문에, 상기 결과를 예상하지 못한 것은 아니었다. 각 항생제 별로 양성 대조군 시료에 대해 상대적인 세균의 차등 성장은 도 3에 보여진다. 다른 시점들에서 각 항생제에 대한 최소 억제 농도 값 및 기준치는 상기 기술된 세균의 차등 성장에 기초하여 계산되었다. 상기 방법으로 얻어진 값들은 기존에 보고된 임상적 최소 억제 농도 값들과 비교되어 하기에 보여진다. 상기 결과는 측정들을 평균하는 대신에 각각의 세균을 샘플로써 얻어진 데이터로 우수한 정확성 및 민감도를 보인다.

[0269] 세포타ksom

[0270] 액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 0.125  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ 이다.

**표 1**

[0271]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	-	0.06	0.125
10%	-	0.06	0.125
15%	0.06	0.03	0.06
20%	0.06	0.03	0.06

[0272] 시프로플록사신

[0273] 액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 0.016  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는  $\leq 0.03 \mu\text{g/ml}$ 이다.

**표 2**

[0274]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	0.016	0.008	0.008
10%	0.008	0.008	0.008
15%	0.008	0.008	0.008
20%	0.008	0.004	0.008

[0275] 젠타마이신

[0276] 액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 0.5~1  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는 1  $\mu\text{g/ml}$ 이다.

**표 3**

[0277]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	1	0.5	1
10%	0.5	0.5	1
15%	0.5	0.5	1
20%	0.5	0.5	1

[0278] 메로페넴

[0279] 액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 0.25~0.5  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는  $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ 이다. 액체배지 시험관 희석법 및 AQUILA 400으로 추정된 최소 억제 농도는 매우 높는데, 그 이유는 오래된 항생제들이 사용되었기 때문이다.

표 4

[0280]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	-	-	0.5
10%	-	-	0.5
15%	-	0.5	0.25
20%	0.5	0.25	0.125

[0281]

세프타지딘

[0282]

액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 0.25  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ 이다.

표 5

[0283]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	0.25	0.125	0.25
10%	0.25	0.125	0.25
15%	0.125	0.125	0.25
20%	0.125	0.125	0.25

[0284]

피페라실린 및 타조박탄

[0285]

액체배지 시험관 희석법에 의한 최소 억제 농도는 4~8  $\mu\text{g/ml}$ 이고, 또 다른 연구실에서 이-테스트(E-test)로 측정한 최소 억제 농도는 2  $\mu\text{g/ml}$ 이다.

표 6

[0286]

기준치	4 시간	6 시간	24 시간
5%	4	4	4
10%	4	4	4
15%	4	4	4
20%	4	2	2

[0287]

실시에 4. 자물쇠 탐침들 및 서클-투-서클 증폭 증폭을 사용하는 항균제 감수성 검사에 의한 항균제 감수성 검사 결정 방법

[0288]

대장균으로 접종된 혈액 배양들이 준비되어 실시예 1에서 기술된 바와 같이 분자 검사가 수행되었다. 상기 분자 검사가 실시되는 동안 계속 배양되어져 온 상기 혈액 배양 플라스크에서 남아 있는 시료 5 ml를 채취하였다. 상기 시료의 세균은 농축되고 실시예 2에서와 같이 물러-힌트 배지로 갈아 주었다.

[0289]

상기 세균 현탁액에서 63  $\mu\text{l}$ 씩의 부분 표본들을 덜어 미세정량 평판의 선별된 각 구멍에 넣었다. 각 구멍은 각기 다른 항생제들을 포함할 뿐만 아니라, 이때 각 항생제는 다양한 농도로 각각의 구멍에 첨가되었다. 하나의 미세정량 평판에 12 가지의 다른 항생제들이 첨가되었는데, 이때 각 항생제는 4 가지 다른 농도로 제공 되었으며 항생제를 포함하지 않는 블랭크(blank)를 하나 준비하였다. 상기 미세정량 평판에서 4 시간 배양 후, 상기 평판의 각 구멍에 있는 세균들을 용해 시켜 이들의 DNA를 방출시켰다.

[0290]

항생제 감수성 검사는 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD)을 사용하여 수행되었는데, 세균을 직접 표지화하기 보다는, 병원균들에서 방출된 상기 DNA를 추출 후 디지털 방식으로 증폭 산물들의 수를 세었다. 상기 분자 검출 검사는 'Goransson 외, 2012'에서 기술된 방법에 따라 상기 세균 DNA 시료를 대상으로 수행 되었다.

[0291]

자물쇠 탐침들 및 표적 포획 탐침들은 INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES(뮌헨, 독일)로부터 구입했다.

[0292]

상기 탐침들은 각 세균의 핵산 서열 상에 있는 독특한 모티프(motif)를 검출할 수 있도록 제작되었으며, 상기 모티프는 생물정보학을 활용하여 선별되었다. 상기 표적 DNA에 대해 상기 포획 탐침들의 혼성화 및 상기 자물쇠 탐침들의 결합은 동시에 수행되었고, 이는 단편화 및 변성된 게놈 DNA를 20 mM 트리스-염화수소(pH 8.3), 25 mM



염화칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 0.5 mM 엔에디(NAD), 0.01% 트리톤 X-100(Triton® X-100), 100 nM 자물쇠 탐침, 50 nM 포획 탐침, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민(NEW ENGLAND BIOLABS, 매사추세츠, 미국), 및 250 mU/ $\mu\text{l}$  앰플리가제(AMPLIGASE)(EPICENTRE BIOTECHNOLOGIES, 위스콘신, 미국)를 포함한 용액에서 5 분간 55 °C에서 항온 처리함으로써 수행되었다. 반응된 상기 자물쇠 탐침들과 함께 상기 표적 DNA는 비오틴이 부착된 포획 탐침들을 통해 자성을 띤 입자들에 포획되었다. 이는 50  $\mu\text{g}$ 의 다이아비드즈 MyOne™ 스트렙타아비딘 T1 비드즈(Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 beads)(INVITROGEN)를 상기 혼성화/결찰 반응에 첨가하고 상기 시료를 상온에서 3 분간 항온 처리함으로써 수행되었다. 과량의 탐침들은 5 mM 트리스-염화수소(pH 7.5), 5 mM 이디티에이(EDTA), 1 M 염화나트륨, 및 0.1% 트윈-20(TWEEN-20)을 포함한 세척 완충용액 100  $\mu\text{l}$ 로 한 번 세척하여 제거되었다. 이어지는 회전환 증폭 반응을 방해할 수 있기 때문에 과량의 선형 자물쇠 탐침들이 제거 되었다.

[0293] 반응된 탐침들은 회전환 증폭과 함께 시작되는 연속적인 효소 반응들을 포함하는 서클-투-서클 증폭에 의해 증폭되었다. 상기 회전환 증폭 반응은 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액(FERMENTAS, Lithuania; 33 mM 트리스 아세테이트(37 °C에서 pH 7.9), 10 mM 마그네슘-아세테이트, 66 mM 칼륨-아세테이트, 0.1%(v/v) 트윈-20(TWEEN-20), 1 mM 디티티(DTT)), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 25 nM 프라이머, 및 100 mU/ $\mu\text{l}$  파이29(phi29) DNA 중합효소를 포함하는 결찰 혼합물 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 시작되었다. 상기 반응은 37 °C에서 11 분간 항온 처리되었고, 및 1분간 65 °C에서 열처리되어 비활성화 되었다. 상기 회전환 증폭 산물들은 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 3 유닛(units)의 AluI 제한효소(NEW ENGLAND BIOLABS), 600 nM 복제 올리고뉴클레오타이드, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민을 첨가하여 37 °C에서 1 분간 절단 되었고, 1분간 65 °C 열처리로 상기 반응은 종결되었다. 결찰, 증폭 및 표지화 반응들은 최종 부피가 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 1x 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 1.36 mM 에티피(ATP), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 28 mU/ $\mu\text{l}$  T4 DNA 연결효소 및 120 mU/ $\mu\text{l}$  파이29(phi29) DNA 중합효소를 포함한 혼합물을 첨가함으로써 수행되었다. 상기 반응들은 7 분간 37 °C에서 항온 처리되었고, 및 1 분간 65 °C 열처리로 종료되었다. 상기 과정은 한 번 반복되었다.

[0294] 마지막 회전환 증폭 반응 후, 상기 회전환 증폭 산물에 상보적인 형광 표지화된 올리고뉴클레오타이드들은 각 5 nM 농도로 첨가되었다. 상기 반응은 2 분간 65 °C에서 항온 처리된 후 5 분간 37 °C에서 식혀졌다.

[0295] 그 다음, 상기 시료들은 AQUILA 400(미국특허출원공보 제. 61/979319호 참조)로 주입되고 회전환 증폭 산물들의 수는 'Jarvis J., 외, Nature Methods 3, 725 - 727 (2006)'에서 기술된 바와 같이 기록되었다. 도 4에서는 시프로플록사신 및 세포탁심의 각 농도에서 배양된 세균 시료에서 검출된 회전환 증폭 산물들의 수가 제시된다. 상기 데이터는 각 항생제에 대한 최소 억제 농도를 추정하는데 사용되었다.

[0296] 실시예 5. 탐침 제작을 위한 전략

[0297] 병원균의 동정은 복합적으로 수행될 수 있다. 이를 위해, 각 병원균에 해당되는 표적 DNA를 찾아내기 위해 3 개의 특이적 포획 올리고뉴클레오타이드들이 준비된다. 또한, 각 병원균에 대해 상기 각각의 포획 올리고뉴클레오타이드 가까이 있는 상기 표적에 혼성화하는 3 개의 특이적 자물쇠 탐침들이 준비된다. 증폭된 단일 분자 검출(amplified single molecule detection, ASMD) 탐침 세트들을 제작하기 위한 과정은 두 가지 주요 단계들로 나눌 수 있다: 최적의 표적 부분들 찾기 및 탐침 서열들 제작하기.

[0298] 하기에 상기 제작 과정을 더 세부적으로 기술한다: 게놈 표적들 찾기 - 게놈 데이터베이스(예를 들어, NCBI)로부터 미생물 게놈 서열들을 얻음 - 게놈 서열들을 표적 및 백그라운드 그룹들로 나누기 - 표적 게놈이 하나 이상일 경우, 모든 서열들에 대해 공통적인 서열 찾기 - 필터 세트를 적용하여 복잡성(complexity)이 낮은 후보들(단독 중합체들, 높거나 낮은 GC 함량(%), 반복 서열들, 등) 제거 - 백그라운드 여과: 백그라운드로 구분된 게놈에서 높은 서열 유사성을 가지는 후보들을 버림 - 수락된 후보들 보고. 탐침들 제작 - 제작될 탐침들(상기 단계에서 선별된)의 서열 정보에 표적 게놈들의 서열 정보를 입력 - 설정값 선택(탐침 길이, 녹는점 온도, 이중/동중이합체 필터, 결찰 필터, 등) - 최적의 탐침 서열들 찾기 - 통과한 후보들 제시 및 짧은 제작 요약.

[0299] 게놈 DNA 표적들을 필터링(filtering) 및 인식에 사용되는 상기 탐침들은 도 5에서 도시되는 바와 같이 구성된다. 상기 포획 탐침은 표적 단편들을 고체 상에 가져오고, 그런 다음 상기 좌물쇠 탐침은 이의 표적에 결합하면서, 원형으로 결찰되고 이어지는 서클-투-서클 증폭 반응에서 증폭된다. 상기 자물쇠 탐침은 두 개의 표적에 상보적인 부분들(5'- 및 3'-팔(arm)) 및 검출에 필요한 자리(충칭적), 제한 효소 절단 및 프라이밍(priming) 자리(충칭적), 어레이(array) 올리고 혼성화 자리(유일한)로 이루어진 백본을 가진다. 상기 백본 부분들은 DO, RO, 및 AO로 지시되며 도 5에서 도시된다. 상기 포획 올리고는 표적 상보적인 부분, CT-연결기 및 고체 상 결합에 필요한 비오틴으로 구성된다.

- [0300] 실시예 6. 혈액 배양 및 분자 검사에 의한 임상 시료에서의 미생물 동정
- [0301] 중환자실에 있는 패혈증으로 의심되는 환자들로부터 혈액을 채취해 BACTEC(BECTON DICKINSON) 혈액 배양 플라스크에 담은 후 혈액 배양 캐비닛에서 배양하였다. 4 시간 배양 후, 상기 플라스크들에 든 시료들이 상기 혈액 배양 캐비닛에서 분석 결과가 확정되어지기 전에 시료가 채취되어 분자 검사들에 사용되었다.
- [0302] 주사기를 사용하여 상기 시료 5 ml을 채취하고, 실시예 1에서 기술되는 바와 같이 가능성 있는 병원균 DNA를 추출했다.
- [0303] 상기 분자 검사는 'Goransson 외, 2012(상기 기술된)'에 기술된 방법에 따라 상기 농축된 세균 DNA 시료를 대상으로 수행되었다.
- [0304] 자물쇠 탐침들 및 표적 포획 탐침들은 INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES(뮌헨, 독일)로부터 구매되었다. 상기 탐침들은 각 세균의 핵산 서열 상에 있는 독특한 모티프(motif)를 검출할 수 있도록 제작되었으며, 상기 모티프는 기관내에서 개발된 생물정보학을 활용하여 선별되었다. 상기 표적 DNA에 대해 상기 포획 탐침들의 혼성화 및 상기 자물쇠 탐침들의 결합은 동시에 수행되었고, 이는 단편화 및 변성된 게놈 DNA를 20 mM 트리스-염화수소(pH 8.3), 25 mM 염화칼륨, 10 mM 염화마그네슘, 0.5 mM 엔에디(NAD), 0.01% 트리톤 X-100(Triton® X-100), 100 nM 자물쇠 탐침, 50 nM 포획 탐침, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민(NEW ENGLAND BIOLABS, 매사추세츠, 미국), 및 250 mU/ $\mu\text{l}$  앰플리가제(AMPLIGASE)(EPICENTRE BIOTECHNOLOGIES, 위스콘신, 미국)를 포함한 용액에서 5 분간 55 °C에서 항온 처리함으로써 수행되었다. 반응된 상기 자물쇠 탐침들과 함께 상기 표적 DNA는 비오틴이 부착된 포획 탐침들을 통해 자성을 띤 입자들에 포획 되었다. 이는 50  $\mu\text{g}$ 의 다이나비드즈 MyOne™ 스트렙타아비딘 T1 비드즈(Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 beads)(INVITROGEN)를 상기 혼성화/결합 반응에 첨가하고 상기 시료를 상온에서 3 분간 항온 처리함으로써 수행되었다. 과량의 탐침들은 5 mM 트리스-염화수소(pH 7.5), 5 mM 이디티에이(EDTA), 1 M 염화나트륨, 및 0.1% 트윈-20(TWEEN-20)을 포함한 세척 완충용액 100  $\mu\text{l}$ 로 한 번 세척하여 제거되었다. 이어지는 회전환 증폭 반응을 방해할 수 있기 때문에 과량의 선형 자물쇠 탐침들이 제거 되었다.
- [0305] 반응된 탐침들은 회전환 증폭과 함께 시작되는 연속적인 효소 반응들을 포함하는 서클-투-서클 증폭에 의해 증폭되었다. 상기 회전환 증폭 반응은 1X 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액(FERMENTAS, Lithuania; 33 mM 트리스 아세테이트(37 °C에서 pH 7.9), 10 mM 마그네슘-아세테이트, 66 mM 칼륨-아세테이트, 0.1%(v/v) 트윈-20(TWEEN-20), 1 mM 디티티(DTT)), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 25 nM 프라이머, 및 100 mU/ $\mu\text{l}$  파이29(phi29) DNA 중합효소를 포함하는 결합 혼합물 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 시작되었다. 상기 반응 37 °C에서 11 분간 항온 처리되었고, 및 1분간 65 °C에서 열처리되어 비활성화 되었다. 상기 회전환 증폭 산물들은 1X 파이29(phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 3 유닛(units)의 AluI 제한효소(NEW ENGLAND BIOLABS), 600 nM 복제 올리고뉴클레오타이드, 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민을 첨가하여 37 °C에서 1 분간 절단 되었고, 1분간 65 °C 열처리로 상기 반응은 종결되었다. 결합, 증폭 및 표지화 반응들은 최종 부피가 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 1X 파이29 (phi29) DNA 중합효소 완충용액에서 1.36 mM 에티피(ATP), 100 uM 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  소혈청알부민, 28 mU/ $\mu\text{l}$  T4 DNA 연결효소 및 120 mU/ $\mu\text{l}$  파이29 (phi29) DNA 중합효소를 포함한 혼합물을 첨가함으로써 수행되었다. 상기 반응들은 7 분간 37 °C에서 항온 처리되었고, 및 1 분간 65 °C 열처리로 종료되었다. 상기 과정은 한 번 반복되었다. 최종 회전환 증폭 후에, 상기 산물들은 한 번 더 단량체들로 절단 되었다. 이로써 상기 회전환 증폭 산물들은 분석될 준비가 된다.
- [0306] 상기 절단된 시료는 마이크로어레이를 포함하는 용기로 옮겨져서, 30 분간 55 °C에서 항온 처리된 후 상온에서 1xSSC 완충용액으로 세척되었다. 다음으로, 상기 혼성화된 회전환 증폭 단량체들은 10 nM 농도의 검출 올리고뉴클레오타이드가 포함된 2 x SSC에서 30 분 동안 55 °C에서 혼성화되어 표지화된 후 상온에서 1 x SSC로 두 번 세척되고 회전 건조되었다.
- [0307] 그 다음, 상기 어레이는 어레이 스캐너에서 스캔되고 이에 얻어진 결과는 어레이 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 상기 결과는 표준화되었고, 백그라운드를 넘어 백그라운드로부터 3배 표준편차들인 데이터만을 진짜 신호로 구분했다.
- [0308] 10 개의 임상 시료들과 하나의 첨가 시료로부터 얻은 데이터가 도 6에서 보여진다. 상기 첨가 시료는 혈액 배양 플라스크에 음성 대조군 시료로부터의 혈액과 함께 대장균이 첨가되어 준비되었다. 상기 첨가된 세균의 양은 플라스크에 최초 존재하는 대장균의 양이 혈액 1 ml 당 10 CFU 일 때, 4시간 동안 배양된 후 존재하게 되는 대장균의 양에 해당된다. 상기 임상 시료들 중 8 개는 혈액 배양 결과 음성이었고, 두 개는 혈액 배양 결과 양성인 것으로 판명되었다. 상기 양성 시료들은 이 후에 한 시료는 대장균 그리고 나머지 한 시료는 스트렙토코커스 뉴

모니에임이 표준 기술들을 사용하여 동정되었다.

[0309] 오직 양성 신호들이 각 시료에 대해 예상되는 어레이 특징들로부터 얻어졌다. 상기 임상 시료들 중 하나는 대장균을 포함하고, 다른 하나는 스트렙토코커스 뉴모니에를 포함하고 있음을 이러한 분석시험에서 밝혀졌다. 또한, 상기 첨가 시료에서도 대장균이 있음을 확인했다. 음성 시료들의 집합에서 평균 신호의 3배 표준 편차로 정의되는 백그라운드를 넘는 신호는 상기 시료 중 어느 시료에서도 보이지 않았고, 이 후에 전통적인 확인 분석시험들을 이용해 상기 결과를 확인했다. 대장균에 대해서는, 시료(Q1101 및 Q799) 당 두 개의 어레이 특징들이 신호를 생기게 했는데, 이는 대장균을 검출하나 다른 어레이 특징들을 보고하는 두 개의 다른 탐침 시스템들이 이 실험에서 사용되었기 때문이다.

[0310] 실시예 7. 혈액 배양 플라스크로부터 부분 표본 채취 후 양성 검출 시간

[0311] 세균이 첨가된 10 개 세트의 혈액 배양 플라스크들이 준비되었다. 5 개 세트는 500 CFU/ml의 농도의 세균이 첨가되고, 나머지 5 개는 50,000 CFU/ml의 농도로 세균이 첨가되었다. 건강한 기증자들로부터 각각 10 ml의 혈액을 채취해서 30 ml의 혈액 배지를 포함한 혈액 배양 플라스크에 첨가하여 배양 플라스크 당 전체 부피가 40 ml이 되게 하였다. 혈액 배양 캐비닛으로 상기 혈액 배양 플라스크들을 넣기 전에, 부분 표본으로 5 ml 채취하였다. 매 30 분 마다 상기 혈액 배양 캐비닛에서 상기 혈액 배양 플라스크들이 양성의 배양 결과를 보이는지를 관찰하였다.

[0312] 양성 검출 시간(time-to-positivity, TTP)은 도 7에 보여지고, 상기 세트간에 두드러진 차이를 발견할 수 없었다. 배양 전에 채취된 부분 표본을 가지는 플라스크들 간에 두드러진 차이를 관찰할 수 없었고, 채취된 부분 표본을 가지지 않는 플라스크들 간에도 큰 차이가 없었다.

[0313] 실시예 8. 혈액 배양 플라스크로부터 부분 표본을 얻기 위한 살균 시료 채취

[0314] 24 개의 혈액 배양 플라스크들(blood culture flasks, BCFs)은 8 개씩 3 가지 그룹들로 나누어졌고, 각 그룹은 하기에 지시된 바 대로 처리되었다:

[0315] 그룹 1: 주사 바늘로 격막에 구멍을 낸

[0316] 그룹 2: 주사 바늘로 격막에 구멍을 내기 전에  $10^8$  CFU/ml의 농도의 대장균을 포함하는 액체 배지로 격막을 닦음

[0317] 그룹 3: 격막에 구멍을 내지 않음

[0318] 멸균된 일회용 주사 바늘이 각 혈액 배양 플라스크에 대해 사용되었다.

[0319] 상기 혈액 배양 플라스크들을 혈액 배양 캐비닛에 위치시켜 5 일간 두었다. 상기 그룹 1 또는 3의 혈액 배양 플라스크들 중 어느 플라스크도 세균 성장이 일어나지 않았다. 그룹 2에서 8 개의 혈액 배양 플라스크들 중 1 개는 5 일 내에 양성을 나타내었는데, 이는 배양 플라스크가 심하게 오염되었을 경우 부분 표본을 채취하기 전에 격막에 있는 오염 물질을 제거할 필요가 있음을 지시한다 (표 7 참조).

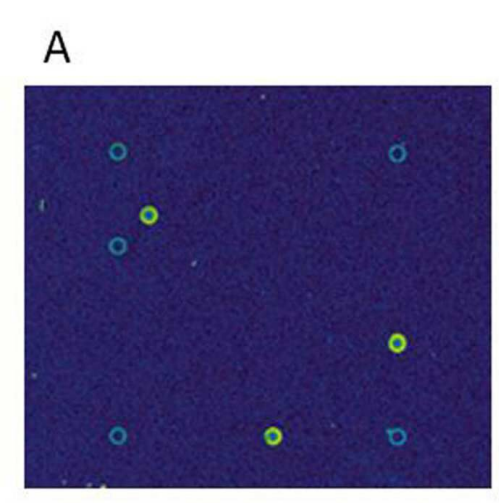
표 7

[0320]

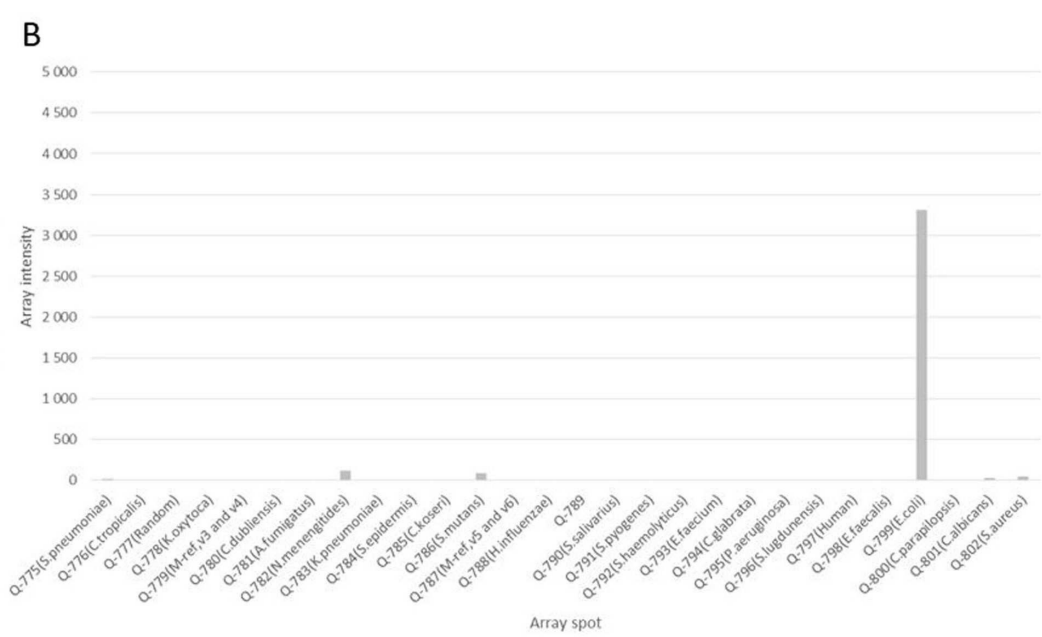
시료	주사 바늘로 격막에 구멍을 낸	주사 바늘로 격막에 구멍을 내기 전 $10^8$ CFU/ml 대장균으로 오염시킴	격막에 구멍 내지 않음
1	음성	음성	음성
2	음성	음성	음성
3	음성	음성	음성
4	음성	음성	음성
6	음성	음성	음성
7	음성	양성	음성
8	음성	음성	음성

도면

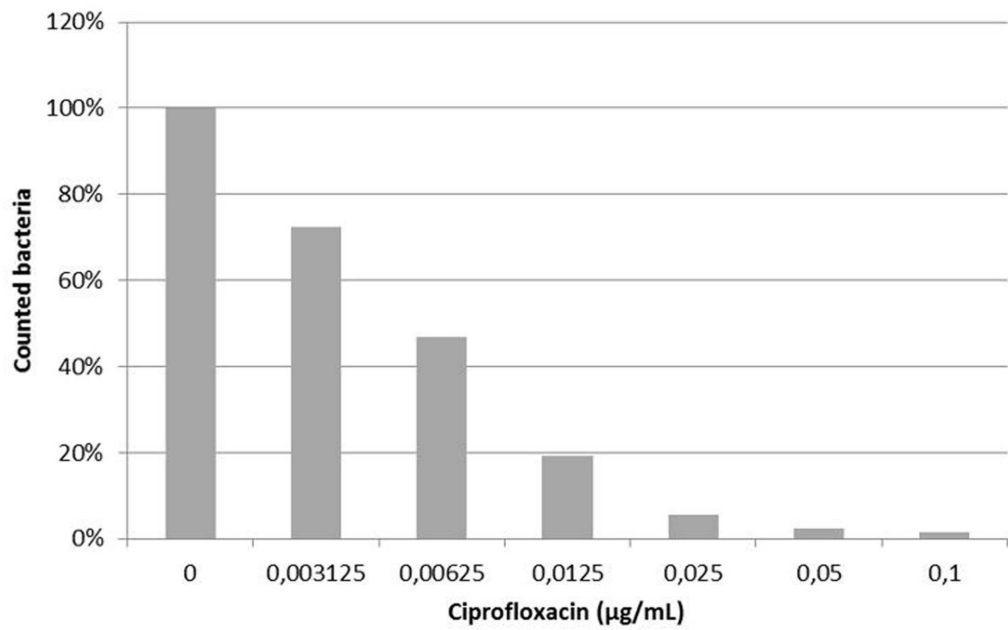
도면1a



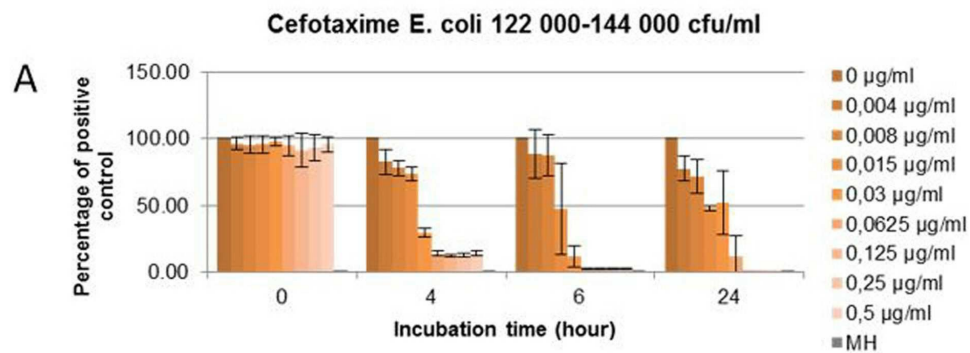
도면1b



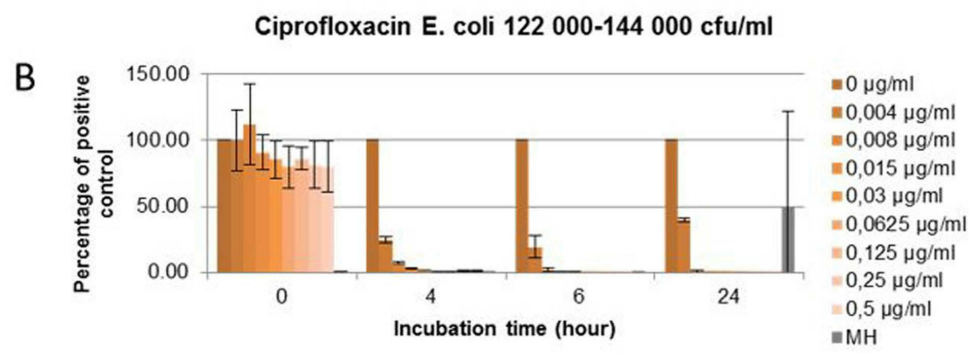
도면2



도면3a

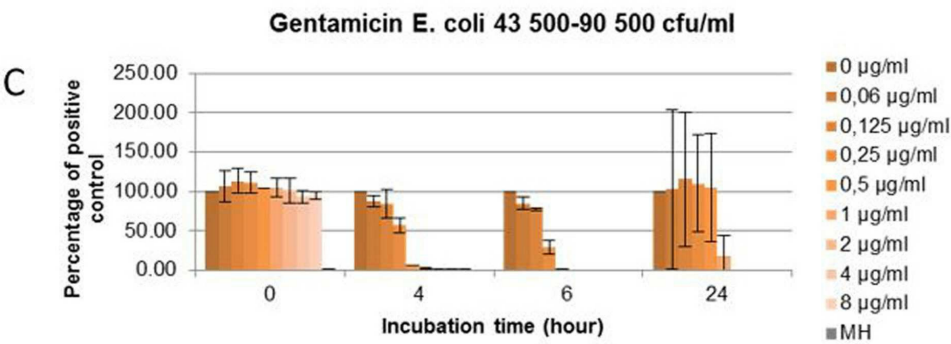


도면3b

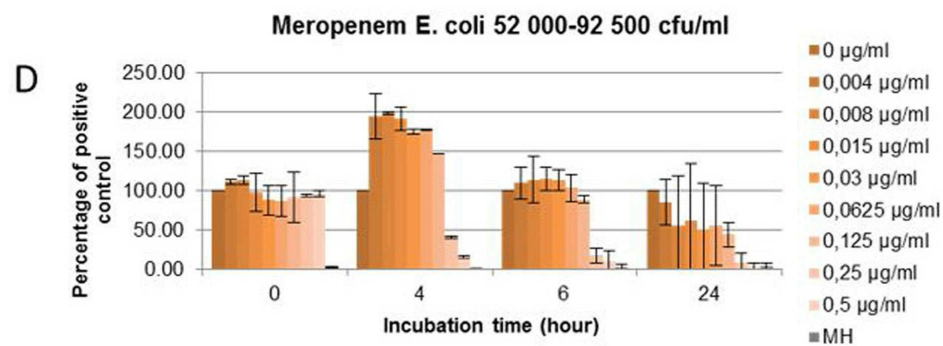




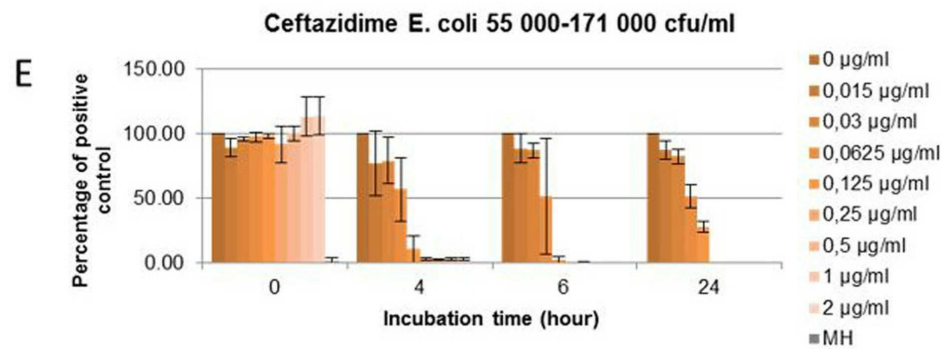
도면3c



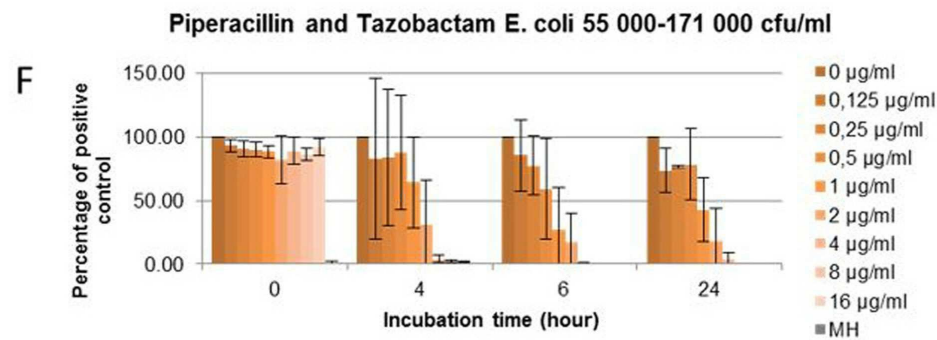
도면3d



도면3e



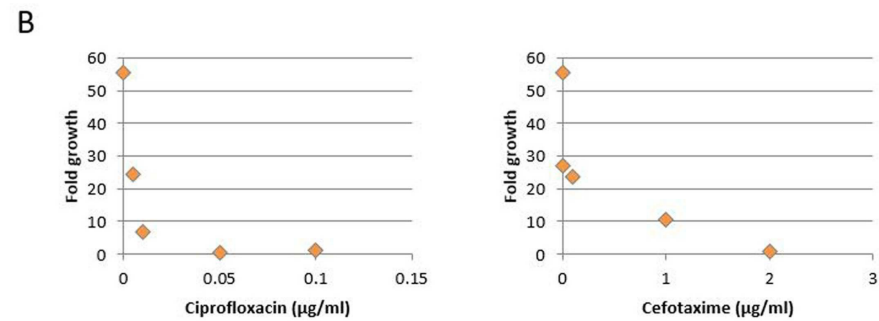
도면3f



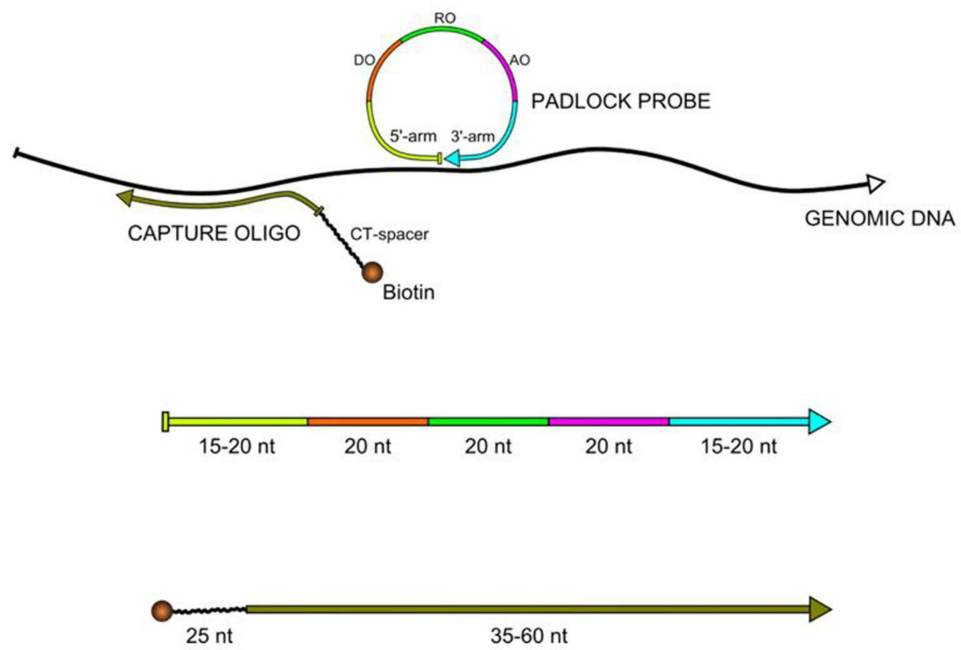
도면4a



도면4b



도면5





도면7

