(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0014866
(43) 공개일자 2016년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) *G01J 3/44* (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0096695
(22) 출원일자 2014년07월29일
심사청구일자 2014년07월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최삼진
서울특별시 동대문구 장안로26길 401호 (장안동, 공감대 4차 아파트)
신재호
서울 서초구 잠원로8길 25, 2동 1303호 (잠원동, 대림아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

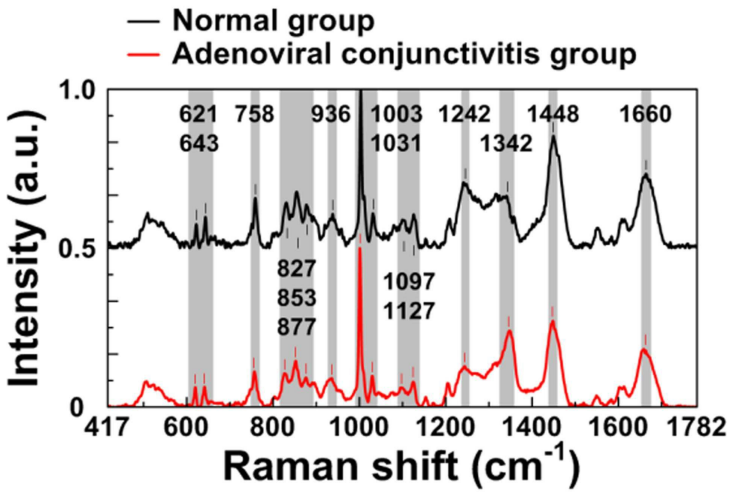
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **눈물 방울을 이용한 바이러스 감염진단 방법 및 기기**

(57) 요 약

본 발명은 기판 상에 건조 눈물시료를 준비하는 제1단계; 상기 건조 눈물시료로부터 라만 스펙트럼을 측정하는 제2단계; 상기 측정된 라만 스펙트럼을 분해하여 가우시안 서브피크를 추출하는 제3단계; 아미드 III β-시트에 상응하는 피크 및 C-H 변형에 상응하는 피크의 상대적인 세기 비율에 대한 로그값을 도출하는 제4단계; 및 상기 도출된 값이 양인 경우 정상으로, 음인 경우 바이러스 감염된 것으로 판단하는 제5단계를 포함하는, 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도9



(72) 발명자

박헌국

서울 동대문구 무학로34길 8

진경현

서울 강남구 압구정로 321, 35동 907호 (압구정동, 한양아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A2054452

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 생체유체 표면증강라만산란을 이용한 바이러스결막염 조기 진단 POC 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

기판 상에 건조 눈물시료를 준비하는 제1단계;

상기 건조 눈물시료로부터 라만 스펙트럼을 측정하는 제2단계;

상기 측정된 라만 스펙트럼을 분해하여 가우시안 서브피크를 추출하는 제3단계;

하기 수식 1에 의해 아미드 III β-시트에 상응하는 피크 및 C-H 변형에 상응하는 피크의 상대적인 세기 비율에 대한 로그값을 도출하는 제4단계; 및

상기 도출된 값이 양인 경우 정상으로, 음인 경우 바이러스 감염된 것으로 판단하는 제5단계를 포함하는, 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법:

[수식 1]

$$AC=\log_{10}\left(\frac{I_{amideIII}\,\beta_{sheet}}{I_{C\text{-}Hdeform}}\right)$$

청구항 2

제1항에 있어서,

제1단계는 드롭-코팅 증착법(drop-coating deposition; DCD)에 의해 수행되는 것인 정보제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

제2단계는 표면증강라만산란 측정법에 의해 수행되는 것인 정보제공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 기판은 나노입자 코팅된 기재인 것인 정보제공 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 측정은 건조 눈물시료의 C 영역, M 영역 또는 T 영역에서 수행되는 것인 정보제공 방법.

청구항 6

제1항에 있어서

상기 아미드 III β-시트에 상응하는 피크는 1242±10 cm^{-1} 범위에서, C-H 변형에 상응하는 피크는 1342±10 cm^{-}

[1] 범위에서, 각각 나타나는 피크인 것인 정보제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

아데노바이러스 감염 여부에 대한 정보를 제공하는 것인 정보제공 방법.

청구항 8

눈물 방울을 가하여 건조 눈물시료를 제공할 수 있는 검출기재;

상기 검출기재를 투입하는 투입부;

상기 투입된 검출기재로부터 라만 신호를 측정하는 신호 측정부;

상기 측정된 라만 피크를 가우시안 서브피크로 분리하는 피크 분해부;

상기 분리된 가우시안 서브피크 중 특정 파장에서 나타나는 2개 피크의 상대적인 비율의 로그값을 도출하는 데이터 프로세싱부; 및

도출된 값을 표시하는 디스플레이부를 포함하는, 바이러스 감염 진단 기기.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 신호 측정부는 광원 및 광자검출기를 구비하고, 선택적으로 미러, 렌즈 및 필터를 추가로 구비한 것인 진단 기기.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 기판 상에 준비된 건조 눈물시료의 라만 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 다중 가우시안 피크를 추출하여 특정한 2개 파장의 세기비를 확인함으로써 바이러스 감염 여부에 대한 정보를 제공하는 방법 및 이를 이용하는 바이러스 감염 진단 기기에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재, 감염성 질환의 진단에 사용되는 방법은, 세포를 채취하여 배양하고 이로부터 유전자를 채취하여 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭시켜 확인하는 복수의 단계로 구성되는 방법을 이용하고 있다. 이러한 방법은 많은 시간과 노력을 필요로 하는 반면, 이들 감염성 질환은 전염성을 갖는 경우가 많아 빠르게 진단하고 처치하는 것이 중요하여, 빠르고 간편하게 감염성 질환을 진단할 수 있는 방법이 요구된다.

[0003] 감염성 안구표면질환의 연구를 위하여 라만 분광법에 기초한 눈물 분석법이 최근 연구되고 있다. 예를 들면, 한국등록특허 제10-1336478호에서는 SERS(Surface-enhanced Raman spectroscopy)를 이용한 눈물 필름 중의 바이러스 입자의 검출을 개시하고 있다.

[0004] 그러나, 선행기술의 라만 분광법에 기초한 눈물 분석법의 경우, 전반적인 SERS 스펙트럼 패턴의 차이를 분석하여 시료 중 바이러스 유무를 진단하는 것으로, 전체 스펙트럼 패턴을 비교하는 것이어서 차이의 분석이 어렵고, 감염 여부를 명확히 진단할 수 있는 경계가 분명하지 않은 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상술한 기술적 배경에서 도출된 것으로서, 빠르고 간편하게 감염성 질환을 진단할 수 있는 바이러스 감염진단 방법 및 기기를 제공하는 것을 그 과제로 한다.

[0006] 본 발명의 다른 과제는 임상현장에서 감염성 질환의 진단시 사용할 수 있는 독립형(stand-alone) 바이러스 감염 진단 기기와 이를 이용한 바이러스 감염진단 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 과제는 라만 분광법에 기초한 눈물 분석법에 있어서, 바이러스 감염 여부를 명확히 진단할 수 있는 바이러스 감염진단 방법 및 기기를 제공하는 것을 그 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 기판 상에 건조 눈물시료를 준비하는 제1단계; 상기 건조 눈물시료로부터 라만 스펙트럼을 측정하는 제2단계; 상기 측정된 라만 스펙트럼을 분해하여 가우시안 서브피크를 추출하는 제3단계; 하기 수식 1에 의해 아미드 III β-시트에 상응하는 피크 및 C-H 변형에 상응하는 피크의 상대적인 세기 비율에 대한 로그값을 도출하는 제4단계; 및 상기 도출된 값이 양인 경우 정상으로, 음인 경우 바이러스 감염된 것으로 판단하는 제5단계를 포함하는, 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법을 제공한다:

[0009] [수식 1]

[0010] $$AC=\log_{10}\left(\frac{I_{amide\,III\,\beta\,sheet}}{I_{C\text{-}Hdeform}}\right)$$

[0011] 본 발명은 십여개의 가우시안 피크가 중첩되어 나타나는 건조 눈물시료의 라만 스펙트럼을 개별 가우시안 피크로 분리하여 특정한 2개의 파장에서의 피크세기비를 확인함으로써 바이러스 감염 여부를 진단할 수 있음을 최초로 확인한 것이 기초한다. 예컨대, 아데노바이러스 감염에 의해 결막염이 발생한 환자의 경우 1342 cm^{-1}에서의 피크세기에 대한 1242 cm^{-1}에서의 피크세기의 상대적인 비율의 로그값이 양에서 음으로 전환됨을 확인하여, 상기 2개 피크가 아데노바이러스 감염 진단에 유용한 변수임을 동정하고, 이를 이용하여 감염여부를 진단하는 방법을 제시하였다.

[0012] 바람직하게 상기 제1단계는 드롭-코팅 증착법(drop-coating deposition; DCD)에 의해 수행될 수 있다.

[0013] 바람직하게, 제2단계는 표면증강라만산란 측정법에 의해 수행될 수 있다.

[0014] 바람직하게, 상기 기판은 나노입자 코팅된 기재를 이용할 수 있다. 나노입자가 코팅된 기재를 이용함으로써 표면증강라만산란을 유발하여 측정의 민감도를 향상시킬 수 있다. 일반적으로 라만 산란은 선택성은 우수하나, 흡수나 형광 등 다른 광학적 검출방법에 비해 신호 세기가 약하여 검출이 용이하지 못한 단점이 있다. 따라서, 이를 극복하기 위하여 민감도가 높은 검출기를 이용하거나 신호를 증강시킬 수 있는 방법을 필요로 한다. 이에 나노입자가 코팅된 기재를 사용하면 나노입자에 의한 표면증강효과에 의해 발생되는 라만 신호가 증강되는 효과를 나타내므로 특별한 검출기의 도움없이도 측정이 가능할 수 있다.

[0015] 바람직하게, 상기 측정은 건조 눈물시료의 C 영역, M 영역 또는 T 영역에서 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명의 구체적인 실시예에서 건조 눈물시료의 4개 영역 즉, C, M, T 및 R 영역에서 각각 라만 스펙트럼을 측정하여 분석한 결과 C, M 및 T 영역에서는 선택된 2개 파장에서의 상대적인 신호세기의 현저한 변화가 관찰되었으나 R 영역에서는 그 변화량이 미미하였다(도 6). 따라서, C, M 또는 T 영역에서 측정함으로써 보다 민감하고

정확한 진단이 가능할 수 있다.

[0017] 바람직하게, 상기 아미드 III β-시트에 상응하는 피크는 1242±10 cm^{-1} 범위에서, C-H 변형에 상응하는 피크는 1342±10 cm^{-1} 범위에서, 각각 나타나는 피크일 수 있다.

[0018] 바람직하게, 본 발명의 정보제공 방법은 아데노바이러스 감염 여부에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 아데노바이러스 결막염을 확진받은 환자와 비감염자의 눈물시료를 비교하였으며, 그 결과 비감염자 시료의 라만 스펙트럼은 C-H 변형에 상응하는 1342 cm^{-1} 피크에 대한 아미드 III β-시트에 상응하는 1242 cm^{-1} 피크의 세기비를 로그값으로 취하였을 경우 항상 양의 값을 나타내는 반면, 아데노바이러스 결막염을 확진받은 환자 시료의 스펙트럼에서는 그 비율이 현저히 감소하여 음의 로그값을 나타내는 것을 확인하였다. 즉, 1200 내지 1500 cm^{-1} 범위의 10여 개의 중첩되어 나타나는 피크를 단일 가우시안 피크로 분리하여 그중 특정한 2개의 피크 특히, 1342 cm^{-1} 및 1242 cm^{-1}에서의 나타나는 피크의 상대적인 세기비를 확인하여 아데노바이러스 감염여부를 확인할 수 있음을 발견하였다.

[0020] 또한, 본 발명은 눈물 방울을 가하여 건조 눈물시료를 제공할 수 있는 검출기재; 상기 투입된 검출기재로부터 라만 신호를 측정하는 신호 측정부; 상기 측정된 라만 피크를 가우시안 서브피크로 분리하는 피크 분해부; 상기 분리된 가우시안 서브피크 중 특정 파장에서 나타나는 2개 피크의 상대적인 비율의 로그값을 도출하는 데이터 프로세싱부; 및 도출된 값을 표시하는 디스플레이부를 포함하는, 바이러스 감염 진단 기기를 제공한다.

[0021] 바람직하게, 본 발명의 진단 기기는 상기 검출기재를 투입하는 투입부를 추가로 구비할 수 있다.

[0022] 바람직하게, 본 발명의 진단 기기에 있어서, 상기 신호 측정부는 광원 및 광자검출기를 구비하고, 선택적으로 미러, 렌즈 및 필터를 추가로 구비할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따르면, 표면증강라만산란과 드롭-코팅 증착법을 융합시킨 DCD-SERS 방법을 사용하여 얻은 스펙트럼으로부터 1200 내지 1500 cm^{-1} 범위의 10여 개의 중첩되어 나타나는 피크를 단일 가우시안 피크로 분리하여 그중 특정한 2개의 피크 특히, 1342 cm^{-1} 및 1242 cm^{-1}에서의 나타나는 피크의 상대적인 세기비를 확인하여 아데노바이러스 감염여부를 확인할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바이러스 감염진단 방법은 종래의 PCR 방법에 비하여 빠른 속도로 바이러스 감염을 진단할 수 있으며, 임상현장에서 감염성 질환의 진단시 사용할 수 있는 독립형(stand-alone) 진단기기를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 실시예에 사용된 두 가지 기판의 표면 상태를 나타내는 도이다.

도 2는 BSS를 이용하여 관찰한 두 가지 기판의 SERS 활성을 나타낸 도이다.

도 3은 비감염자 및 아데노바이러스 결막염 확진 환자로부터 수집한 눈물시료의 대표적인 DCD-SERS 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 4는 음성대조군으로서 BSS를 이용하여 측정한 DCD-SERS 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 실시예에서 신뢰성 있는 DCD_SERS 스펙트럼을 얻기 위하여 구분한 건조 눈물시료의 각 영역의

LM 사진이다.

도 6은 도 5의 각 영역으로부터 사용한 눈물의 양에 따른 DCD-SERS 스펙트럼의 특성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 임의의 시간 변화에 대한 입자의 중앙에서 고리 부분으로의 이동을 유한요소해석 기술을 이용하여 해석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 동일한 시료의 동일한 영역 내의 각기 다른 10개 지점에서 측정한 DCD-SERS 스펙트럼을 중첩시켜 나타낸 도이다.

도 9는 비감염자와 아데노바이러스 결막염 환자로부터 채취한 시료의 DCD-SERS 스펙트럼 및 특성 라만 피크를 나타낸 도이다.

도 10은 C 영역에서 비감염자군 및 아데노바이러스 결막염 환자군의 3개 PC 프로파일의 로딩 플롯을 나타낸 도이다.

도 11은 C 영역과 R 영역에 대해 1200~1500 cm^{-1} 파장에서 측정된 DCD-SERS 스펙트럼 및 이로부터 추출한 각 10개의 가우시안 서브피크 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명에 따른 휴대용 바이러스 감염 진단 기기와 바이러스 감염 여부에 대한 정보제공 방법을 이용하여 바이러스 감염 여부를 진단하는 전체 시스템을 개략적으로 도시한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0027] **실시예 1: 시료 수집 및 측정**

[0028] 경희대학병원을 내원한 환자 중에서 환자의 동의를 얻어 아데노바이러스 결막염 확진을 받은 환자 8명(36±14 yr) 및 정상인 8명(33±8 yr)을 대상으로 눈물시료를 채취하였다. 본 연구는 경희대 IRB KMCIRN1401-02를 통과하였다.

[0029] 눈물의 수집은 외부의 자극 없이 직경 4 mm, 길이 10 mm의 폴리에스테르-섬유 막대(polyester-fiber rod, Transorb Wick, USA)를 이용하여, 비하결막낭(nasoinferior conjunctival sac)에서 5분 동안 시행되었고 눈에서 제거한 막대는 에펜도르프 튜브에 넣고 15분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 막대를 제거한 후 파라필름(Pechiney, Plastic Packing Company, USA)으로 봉하여 -70℃에 24시간 이내로 보관하였다. 본 발명에 따른 측정을 수행하기까지는 24시간을 초과하지 않았다.

[0030] 상기 채취한 눈물시료로부터 라만 스펙트럼을 얻기 위하여 표면증강라만산란(surface enhanced Raman scattering; SERS)과 드롭-코팅 증착법(drop-coating deposition; DCD)을 융합시킨 DCD-SERS 스펙트럼 방법을 사용하였다. 구체적으로, 50 nm Au가 코팅된 양극처리된 산화알루미늄(anodized aluminum oxide; AAO) 나노도트 어레이 기판(nanodot array substrate)과 시판되는 2.5 nm Ti 및 50 nm Au로 코팅된 Au.0500.ALSI(Platypus technologies, USA) 기판을 사용하였다. 눈물 약 2㎕를 깨끗한 기판에 떨어뜨리고 건조시켜 측정을 위한 시료를 준비하였다. 200 mW 출력의 785 nm 다이오드 레이저원을 구비한 SENTERRA confocal Raman system(Bruker Optics Inc., USA)을 사용하였다. 이외에 휴대용 라만으로도 측정 가능하였다. 공지된 방법에 따라 4개의 영역(중심으로부터 각각 C, M, T 및 R 존)으로 구분한 건조된 눈물에 레이저를 조사하여 30초 동안 검사를 수행하였다. 측정된 스펙트럼은 417-1782 cm^{-1} 범위를 가지며 중심 스펙트럼은 1200 cm^{-1}이었다.

[0031] **실시예 2: 진단**

[0032] **2.1. 진단마커 1: AC**

[0033] 하기 수식 1과 같이 C-H 변형(deformation)에 상응하는 1342 cm^{-1} 파장에서의 라만세기에 대한 아미드 III β-시트에 상응하는 1242 cm^{-1} 파장에서의 라만세기의 비율의 로그값을 AC 바이오마커로 정의하였다(하기 수식 참조). 감염되지 않은 정상 눈물에서는 1242 cm^{-1} 파장에서의 아미드 III β-시트가 1342 cm^{-1} 파장에서의 C-H 변형보다 항상 큰 값을 가지므로 AC 진단마커는 항상 양의 값을 나타내는 반면, 아데노바이러스 에 감염된 결막염 환자의 경우 1342 cm^{-1} 피크의 상대적인 세기가 증가하여 AC 마커가 음의 값을 나타내었다.

[0034] $$AC=\log_{10}\left(\frac{I_{1242}}{I_{1342}}\right)$$

[0035] 상기 식에서 I1242 및 I1342는 각각 1242 cm^{-1} 및 1342 cm^{-1} 파장에서 라만세기이다. 상기 계산은 MATLAB 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0036] **2.2. 진단마커 2: 주성분분석(principal component analysis; PCA) 알고리즘**

[0037] 주성분분석법은 고차원 특징벡터를 저차원 특징벡터로 축소하는 특징벡터의 차원 축소뿐만 아니라 데이터의 시각화와 특징 추출에도 유용하게 사용되는 데이터 처리 기법의 하나이다. 각각 1242 cm^{-1}, 1342 cm^{-1} 및 1448 cm^{-1}에서 정의된 3개의 DCD-SERS 스펙트럼을 아데노바이러스 감염여부 검출을 위한 전달함수의 입력으로 사용하였다. 구체적으로, Z-스코어법에 의해 일반화된 3개의 벡터 [1242 cm^{-1}, 1342 cm^{-1}], [1242 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}] 및 [1342 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]를 제안된 전달함수의 입력으로 사용하였다. 주성분분석법의 성능을 수신기 작동 특성 곡선(receiver operating characteristic curve; ROC curve) 분석법으로 평가하였으며, 이를 위한 알고리즘은 MATLAB 소프트웨어에서 구현되었다.

[0038] **2.3. 진단마커 3: 다중 가우시안 특성피크(multiple Gaussian peaks; MGPs) 분리법**

[0039] 정상 및 아데노바이러스 감염에 의한 결막염 사이의 차이를 구분하기 위하여 DCD-SERS 스펙트럼으로부터 다중 특성피크를 분리하는 방법을 사용하였다. 즉, 단일 가우시안함수의 이산 버전은 하기 수식으로 정의할 수 있다:

[0040] $$g_k(f)=H_k\exp\left(\frac{(f-f_k)^2}{2w_k^{\,2}}\right),$$

[0041] 상기 식에서, H_k는 단일 가우시안 함수의 진폭(amplitude), f_k는 단일 가우시안 함수의 최대 주파수 위치, w_k는 단일 가우시안 함수의 반너비(half-width)이다.

[0042] 상기 수식을 이용하여 최적화한 스펙트럼의 가우시안 곡선은 하기 수식으로 표시되는 가우시안 함수의 합으로 표현할 수 있다:

[0043] $$G(f)=\sum_{k=1}^{m} g_k(f),$$

[0044] 상기 식에서 m은 전체 가우시안 함수의 개수이다.

[0045] 1200 내지 1500 cm^{-1} 범위의 DCD-SERS 스펙트럼을 상기 수식을 이용한 특성 피크 추출을 위한 다중 가우시안 모델의 입력으로 사용하였다. 측정된 스펙트럼으로부터 다중 가우시안 피크(multiple Gaussian peaks; MGPs)를 추출하기 위하여, 상기 범위 내에서 30 cm^{-1} 파장 간격을 갖도록 m=10 즉, 10개의 가우시안 피크를 선택하였다. 건

조된 눈물 방울의 4개 영역으로부터 가우시안 피크의 파장 이동(라만 이동; Raman shift), 진폭(라만 세기), 반너비 및 면적을 추출하여 평가하였다. 가우시안 분해를 이용한 다중 가우시안 특성 피크의 추출 알고리즘 또한 MATLAB 소프트웨어에서 구현하였다.

[0046] 평균과 표준편차의 기본 표현을 갖는 통계분석은 2개 그룹 간의 평균값 차이의 비교를 위하여 양측 스튜던트 t-테스트(two-tailed Student's t-test) 방법을 사용하였고, 건조된 눈물 방울의 형태학적 DCD-SERS 스펙트럼의 세기는 일원변량분석(ANOVA)을 이용하여 분석하였다. 사후 검증(post-hoc comparison)에는 SNK(Student-Newman-Keuls) 테스트를 사용하였다. AC 바이오마커의 분석학적 효율을 평가하기 위하여 민감도(sensitivity), 특이도(specificity), 정확도(accuracy), 출현율(prevalence) 및 오차율(error rate)과 같은 임상적 분석을 사용하였으며, 주성분분석 바이오마커의 효율과 각각의 변수의 최적 한계점을 평가하기 위하여 AUC(ROC 곡선 하단 면적)와 같은 ROC 분석법을 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0047] **<결과>**

[0048] 먼저, 본 발명에 사용된 2가지 기판 즉, 50 nm Au가 코팅된 양극처리된 산화알루미늄 나노도트 어레이 기판과 2.5 nm Ti 및 50 nm Au로 코팅된 Au.0500.ALSI 기판의 표면 특성을 AFM을 이용하여 관찰하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0049] 상기 표면 특성 분석을 위하여 탭핑 모드 AFM 장치인 NANOS N8 NEOS(Bruker, Germany)를 사용하였으며, 사용된 2종의 SERS 기판의 표면조도 분석 결과, 2.5 nm Ti 및 50 nm Au로 코팅된 Au.0500.ALSI 기판이 50 nm Au가 코팅된 양극처리된 산화알루미늄 나노도트 어레이 기판에 비해 10배 정도 감소된 표면조도 특성을 나타냄을 확인하였다.

표 1

[0050]

표면조도 parameter	Au.0500.ALSI		AAO nanodot array	
Coating	2.5 nm Ti & 50 nm Au		50 nm Au	
Substrate	Aluminosilicate		AAO-based nanodot array	
Surface roughness parameter	5 μm×5 μm	1 μm×1 μm	5 μm×5 μm	1 μm×1 μm
Mean roughness (nm)	1.0±0.3	0.9±0.2	10.8±2.3	11.9±0.9
RMS roughness (nm)	1.2±0.3	1.1±0.2	14.4±3.7	15.4±1.2
Peak-to-peak height roughness (nm)	10.8±1.1	9.3±0.8	129.6±12.6	81.1±7.5

*AAO, anodized aluminum oxide; RMS, root-mean-square.

[0051] 임상에서 안구 세척용으로 사용되는 균형염용액(balanced salt solution; BSS)을 이용하여 상기 2종 기판 자체의 SERS 활성을 관찰하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 839 cm^{-1}(프롤린 고리의 대칭 C-C-C 신축진동), 945 및 969 cm^{-1}(아세테이트 음이온의 대칭 C-C 신축진동), 1060~1078 cm^{-1}(대칭 C-N 신축진동), 1356 cm^{-1}(메틸 CH_3 그룹의 대칭 굽힘진동), 및 1438 및 1462 cm^{-1}(메틸 CH_3 그룹의 비대칭 변형 또는 메틸렌 CH_2 그룹의 대칭 변형)의 파장대역에서 7개 현저한 라만 밴드가 존재하는 것으로 알려져 있다(Podstawka, E. *et al.*, *Biopolymers*, 2006, 83: 193-203; Musumeci, A.W. *et al.*, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2007, 67: 649-661).

[0052] 상기 2종의 SERS 기판은 유사한 스펙트럼 패턴을 나타내었으나, AAO 나노도트 어레이 기판에서 약 2배 강한 세기를 나타내었으며, 전반적으로 상기 AAO 나노도트 어레이 기판이 시판되는 Au.0500.ALSI 기판에 비해 우수한 나노구조 및 DCD-SERS 활성을 나타내었다.

[0053] 다양한 조건에서 데이트를 수집하여 데이터 간의 편차를 줄이기 위하여 DCD-SERS 스펙트럼에 전-공정 처리를 수행하였다. 우선 비감염자 및 아데노바이러스 결막염 확진 환자로부터 수집한 눈물시료의 대표적인 DCD-SERS 스펙트럼을 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 각각의 DCD-SERS 스펙트럼은 눈물시료 고유의 진동 특성을 나타내었다. 바탕신호를 제거한 DCD-SERS 스펙트럼(빨간색)은 바탕신호가 포함된 스펙트럼(검정색)에 비해 보다 명확한 라만 피크 정보를 제공하였다. 그러나, 라만 세기 차이에 의한 바탕신호가 제거된 DCD-SERS 스펙트럼에서도 비감염자(도 3A)와 결막염 환자(도 3B)로부터의 신호를 정량적으로 비교하는 것은 불가능하였다. 그러

나, 정상화된 DCD-SERS 스펙트럼(파란색)의 경우 비로서 정성 및 정량적인 비교가 가능하였다.

[0054] 음성대조군으로서 BSS를 이용하여 측정한 DCD-SERS 스펙트럼을 도 4에 나타내었다. 도 4로부터 BSS에 대한 DCD-SERS 스펙트럼의 경우 이전 2개 시료에 대해 측정된 스펙트럼에 비해 낮은 바탕신호를 나타냄을 확인하였다. 실험군에서와 같이 바탕신호와 정상화된 DCD-SERS 스펙트럼은 명확한 라만 피크 정보를 제공하였으며, 상부 도면으로부터 비감염자 및 아데노바이러스 결막염 환자 시료의 정성 또는 정량 비교가 가능함을 확인하였다.

[0055] 모든 실험에 있어서 2 μl의 눈물을 사용하였으며, 전체 건조시간은 20분이 소요되었고 이로부터 약 4 mm 직경의 건조 눈물시료를 수득하였다. 하드웨어 상에서의 구현을 위하여 보다 신뢰할만한 DCD-SERS 스펙트럼을 얻기 위하여 건조된 눈물의 구분된 각 영역에 따른 DCD-SERS 스펙트럼을 측정하여 비교하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 건조 눈물시료를 크게 3개 영역 즉, R, M 및 C 영역으로 구분하였고, 최외각에 위치한 링 부분을 다시 R과 T 2개 영역으로 세분화하여 관찰하였다. 도 5에는 각 영역의 LM(광학현미경; light microscope) 사진을 도시하였다.

[0056] 나아가, 상기 각 영역으로부터 사용한 눈물의 양에 따른 DCD-SERS 스펙트럼의 특성을 확인하고, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 먼저 약 1 μl의 눈물 방울을 사용한 경우, C와 T 영역에서 DCD-SERS 스펙트럼은 매우 낮은 세기를 나타낸 반면, R 및 M 영역에서는 강한 세기를 나타내었다. ANOVA 테스트($p<0.001$, F-ratio=233.32)와 사후 검증(SNK test; $p<0.05$) 결과, 4개 영역에서의 DCD-SERS 스펙트럼 세기는 유의한 차이를 나타냄을 확인하였다. 보다 증가된 양(4 μl 및 8 μl)의 눈물을 사용한 경우에도 유사한 패턴을 나타내었다. 즉, R 영역에서 C 영역으로 갈수록 신호의 세기는 선형적으로 감소하였다.

[0057] 상기 눈물의 양에 따른 신호세기 변화는, 도 7에 나타난 바와 같이, 증발 프로세서 모세관 유속(evaporation processor capillary flow rate)의 변화에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 도 7은 임의의 시간 변화에 대한 입자의 중앙에서 고리 부분으로의 이동을 유한요소해석 기술을 이용하여 해석한 결과를 나타낸다.

[0058] 도 6을 보다 구체적으로 비교해 보면, 전반적으로 R 영역에서 높은 세기를 나타내기는 하나 전술한 바와 같이 정상화 과정을 수행하게 되면 이와 같은 차이는 제거되었다. 스펙트럼에서 화살표로 나타낸 부분은 각각 1242 cm^{-1} 및 1342 cm^{-1}에 해당하는 것으로 상기 스펙트럼은 아데노바이러스 결막염 확진 환자로부터 채취한 시료에 대해 측정된 것임에도 불구하고 R 영역에서의 스펙트럼 패턴 특히, 상기 2개 파장에서의 상대적인 피크 세기는 다른 영역에서 나타나는 패턴과 상이함을 확인하였다.

[0059] 동일한 시료의 동일한 영역 내의 각기 다른 10개 지점에서 측정한 DCD-SERS 스펙트럼을 중첩시켜 도 8에 도시하였다. MATLAB 소프트웨어의 CORR 함수를 사용하여 도출한 측정한 10개 DCD-SERS 스펙트럼의 평균 짝 선형 상관계수(mean pairwise linear correlation coefficient)는 99.29±0.04%를 나타내었다. 특히, 관심영역인 1242 cm^{-1} 및 1342 cm^{-1}에서 DCD-SERS 스펙트럼의 세기변이(intensity variation)는 각각 340±26.47 및 275.88±20.2로, CV(coefficients of variation, RSD)는 각각 7.77%와 7.37%로 나타났다. 이와 같은 결과는 본 발명에서 제안된 시료 제조방법이 매우 일관된 DCD-SERS 스펙트럼을 제공함을 나타내는 것이다. 제안된 방법으로 준비한 시료에 대해 14주 후 측정한 라만 스펙트럼도 피크의 이동이나 세기에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0060] 도 9는 비감염자와 아데노바이러스 결막염 환자로부터 채취한 시료의 DCD-SERS 스펙트럼을 나타낸 것으로, 획득한 스펙트럼을 비교하여 라만 피크 별로 정리하여 각 피크의 특성을 어사인하였다. 구체적으로, 621 cm^{-1} 피크는 5원 고리 변형과, 643 cm^{-1} 피크는 티민 고리 각 굽힘과, 758 cm^{-1} 피크는 트립토판 고리 숨(breath)과, 853 cm^{-1} 피크는 타이로신 고리 숨과, 877 cm^{-1} 피크는 지질에서 대칭 C-C 신축과, 936 cm^{-1} 피크는 단백질에서 C-C 골격과, 1003 cm^{-1} 피크는 페닐알라닌 대칭 고리 숨과, 1031 cm^{-1} 피크는 페닐알라닌과, 1097 cm^{-1} 피크는 O-P-O 신축과, 1127 cm^{-1} 피크는 단백질의 C-N 및 C-C 신축과, 1242 cm^{-1} 피크는 아미드 III β-시트와, 1275 cm^{-1} 피크는

아미드 III α-나선과, 1342 cm^{-1} 피크는 단백질에서 C-H 변형과, 1448 cm^{-1} 피크는 DNA/RNA, 단백질, 지질 및 탄수화물에서 C-H 변형과, 1660 cm^{-1} 피크는 아미드 I α-나선과 관련이 있음을 확인하였다.

[0061] 비감염자 및 아데노바이러스 결막염 환자로부터 채취한 눈물 시료에 대한 로그형태의 AC 바이오마커의 퍼포먼스를 하기 표 2에, 임상시험 결과(각각 n=100)를 표 3에 나타내었다.

표 2

[0062]

Measure	정상그룹				Adenoviral conjunctivitis group			
	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역
Sensitivity (%)	100	100	100	100				
Specificity (%)					100	100	100	100
Accuracy (%)	100	96	95	94	100	98	79	60
Error rate (%)	0	4	5	6	0	2	21	40
Prevalence (%)	100	96	95	94	0	2	21	40

표 3

[0063]

Dried teardrop	Normal group					Adenoviral conjunctivitis group				
	TP	TN	FP	FN	Total	TP	TN	FP	FN
C zone	100	100	0	0	0	100	0	100	0	0
M zone	100	96	0	4	0	100	0	98	0	2
T zone	100	95	0	5	0	100	0	78	0	21
R	100	94	0	6	0	100	0	60	0	40

[0064] 제안된 4개 영역으로부터 측정한 200개의 DCD-SERS 스펙트럼을 평가하였다. 먼저, 비감염자의 눈물의 AC 바이오마커는 영역에 무관하게 100% 민감도(sensitivity) 및 97% 정확도(accuracy)를 나타내었다. 비감염자군은 C 영역에서 허위양성(false positive) 스펙트럼은 관찰되지 않았으나, 다른 영역에서는 약간의 허위양성 스펙트럼이 존재하였다. 한편, 아데노바이러스 결막염 환자군의 경우 허위양성 스펙트럼 없이 모든 영역에서 100% 특이성(specificity)을 나타내었으며, C 영역에서 100%, R 영역에서 60%의 정확도를 나타내었다. T 영역에서의 오차율(error rate)은 R 영역에 대한 값의 절반 수준이었다. AC 바이오마커는 C 및 M 영역에서 99%의 높은 정확도를, T 및 R 영역에서는 약 70%의 정확도를 나타내었다.

[0065] 또한 아데노바이러스 결막염의 중증도(severity)에 따른 AC 바이오마커를 확인하였다. 아데노바이러스 결막염 중증도에 따른 로그형태의 AC 바이오마커 퍼포먼스를 표 4에, 중증도에 따라 분리한 임상시험 결과를 표 5에 나타내었다. 구체적으로 R 영역에서 마일드한 아데노바이러스 결막염의 경우 27%의 정확도를 나타낸 반면, 중증 아데노바이러스 결막염의 경우 86% 정확도를 나타내었으며, 이외의 영역에서는 약 80% 이상의 높은 정확도를 나타내었으며, 특히 C 영역에서는 100%의 정확도를 나타내었다. 이와 같은 결과는 최외각 고리 영역(R 영역)을 제외한 영역이 아데노바이러스 감염 여부를 진단하기 위한 좋은 라만 스펙트럼 스크리닝 영역이며, 이들 영역에서의 AC 마커는 조기진단을 위한 우수한 파라미터임을 나타내는 것이다.

표 4

[0066]

Measure	Mild adenoviral conjunctivitis group				Severe adenoviral conjunctivitis group			
	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역
Specificity (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
Accuracy (%)	100	96	80	27	100	100	78	86
Error rate (%)	0	4	20	73	0	0	22	14

표 5

[0067]

Dried teardrop	Mild 아데노바이러스 결막염 그룹					Severe 아데노바이러스 결막염 그룹				
	Total	TP	TN	FP	FN	Total	TP	TN	FP	FN
C zone	50	0	50	0	0	50	0	50	0	0
M zone	50	0	48	0	2	50	0	50	0	0
T zone	50	0	40	0	10	50	0	39	0	11
R zone	50	0	12	0	33	50	0	43	0	7

[0068] 나아가, 3개 PC 로딩 프로파일(PC1, PC2 및 PC3)을 비감염자의 눈물, 아데노바이러스 결막염 환자의 눈물 및 2개의 차이에 의한 정보로부터 추출하였다. 이는 4개 영역에서 3개 DCD-SERS 스펙트럼 벡터, [1242 cm^{-1}, 1342 cm^{-1}], [1242 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}] 및 [1342 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]에서 수행하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0069] 도 10은 C 영역에서 비감염자군 및 아데노바이러스 결막염 환자군의 3개 PC 프로파일의 로딩 플롯을 나타낸다. 도 10A에 나타난 바와 같이, 스펙트럼 벡터 [1242 cm^{-1}, 1342 cm^{-1}]에서 PC1 대 PC2와 PC1 대 PC3, 및 [1342 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]에서 PC1 대 PC3의 경우 적은 변이를 나타내는 한편, [1242 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]에서 PC1 대 PC2의 아데노바이러스 결막염 로딩 프로파일은 넓게 분포하였다. 이러한 분포는 영역에 무관하게 [1242 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]에 비해 [1242 cm^{-1}, 1342 cm^{-1}] 및 [1342 cm^{-1}, 1448 cm^{-1}]에서 높은 AUC를 나타냄을 알 수 있었다(표 6).

표 6

[0070]

PCA biomarker	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역
[1242, 1342] cm^{-1}	0.9427	0.9007	0.8790	0.7577
[1242, 1448] cm^{-1}	0.9260	0.8767	0.8423	0.7517
[1342, 1448] cm^{-1}	0.9673	0.9707	0.9550	0.9453

[0071] 즉, PCA 바이오마커는 C 영역에서 0.9453, R 영역에서 0.8182의 AUC 값을 나타내었고, 모든 PCA 바이오마커는 R 영역에서 93% 이상의 높은 민감도와 98%의 비감염 눈물시료 검출 능력을 나타내었다(표 7). PCA 바이오마커의 특이성은 C 영역에서 95%, M 영역에서 91%, T 영역에서 86%, R 영역에서 76%로 나타났다. 이와 같은 결과는 R 영역보다는 C 영역에서의 측정이 아데노바이러스 결막염에 대한 우수한 진단능을 가짐을 나타내는 것이다. DCD-SERS 스펙트럼에서 PC1과 PC2의 로딩 프로파일은 전체의 98%를 차지하였다. 수동적으로 설정한 도 10의 선형 분리선(separating line; 빨간색 점선)으로 비감염자와 아데노바이러스 결막염 환자의 차이를 구분할 수 있었다. 이와 같은 주성분분석 기반의 데이터베이스 분류 시스템은 아데노바이러스 결막염의 조기진단에 유용하게 사용될 수 있다.

표 7

[0072]

PCA biomarker	Sensitivity (%)				Specificity (%)			
	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역
[1242, 1342] cm^{-1}	100.0	93.3	100.0	95.0	89.2	86.6	81.6	70.0
[1242, 1448] cm^{-1}	86.6	91.6	93.3	100.0	97.7	86.6	81.6	65.0
[1342, 1448] cm^{-1}	93.3	95.0	98.3	98.3	96.6	98.3	95.0	91.6

[0073] C 영역과 R 영역에 대해 1200~1500 cm^{-1} 파장에서 측정된 DCD-SERS 스펙트럼 및 이로부터 추출한 각 10개의 가우시안 서브피크를 도 11에 나타내었다. 10개 가우시안 함수로부터 재구성한 곡선-최적화된(curve-fitted) DCD-SERS 스펙트럼은 측정된 스펙트럼 자체와 거의 일치하였다. 비감염자의 눈물(도 11A 및 11C)의 경우 각 영역에서 아미드 III β-시트 진동에 해당하는 1242 cm^{-1} 파장에서의 세기가 C-H 변형 진동에 해당하는 1342 cm^{-1} 파장에서의 세기보다 더 강하게 나타났다. 한편, 아데노바이러스 결막염 환자의 눈물의 경우 C 영역에서 반대의 패턴으로 즉, 1342 cm^{-1} 파장에서의 세기가 더 강하게 나타난 반면, R 영역에서는 그 차이가 미미하여 정상과 유사한 패턴을 나타내었다. 각각의 추출된 가우시안 함수는 생화학적 특성을 잘 반영하였으며, 각각의 가우시안 함

수로부터 면적, 세기, 라만 이동 및 반너비의 4개 특성 파라미터를 도출하였다(표 8).

표 8

C 영역 of a dried teardrop				
m-가우시안 peak	정상 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	2.69 ± 1.63	0.1655 ± 0.0457	1205.72 ± 0.98	14.69 ± 6.61
P2	4.41 ± 1.09	0.1314 ± 0.0187	1241.37 ± 3.51	12.49 ± 2.45
P3	23.30 ± 8.22	0.2487 ± 0.1647	1274.79 ± 4.34	72.01 ± 14.19
P4	18.66 ± 2.91	0.4221 ± 0.0526	1315.81 ± 4.31	42.32 ± 11.04
P5	7.24 ± 5.65	0.2709 ± 0.1395	1340.59 ± 1.48	23.01 ± 6.44
P6	6.66 ± 5.89	0.2682 ± 0.2197	1358.15 ± 2.41	21.37 ± 7.34
P7	6.05 ± 4.02	0.1798 ± 0.0906	1390.72 ± 8.56	28.56 ± 9.23
P8	4.83 ± 5.59	0.1574 ± 0.1192	1413.25 ± 7.93	22.93 ± 11.87
P9	2.60 ± 3.24	0.1516 ± 0.1480	1426.91 ± 13.89	12.77 ± 5.49
P10	27.13 ± 1.61	0.7355 ± 0.1020	1453.86 ± 5.01	34.99 ± 3.96
m-가우시안 peak	아데노바이러스 결막염 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	3.87 ± 2.66	0.1550 ± 0.0522	1206.77 ± 1.52	21.31 ± 8.92
P2	13.78 ± 2.57	0.3251 ± 0.0704	1242.77 ± 1.73	40.63 ± 8.61
P3	6.50 ± 3.63	0.2063 ± 0.1001	1276.80 ± 1.31	28.37 ± 4.27
P4	12.32 ± 2.41	0.3295 ± 0.0925	1310.49 ± 1.06	36.02 ± 6.09
P5	11.70 ± 1.71	0.3831 ± 0.0697	1342.40 ± 3.17	28.97 ± 3.42
P6	2.83 ± 2.20	0.1449 ± 0.1020	1358.97 ± 0.75	16.11 ± 4.39
P7	5.62 ± 1.00	0.1888 ± 0.0511	1382.61 ± 1.79	28.73 ± 4.94
P8	3.09 ± 1.32	0.1489 ± 0.0690	1403.84 ± 2.77	19.78 ± 2.07
P9	2.00 ± 1.37	0.1154 ± 0.0644	1418.43 ± 1.01	15.15 ± 2.91
P10	24.29 ± 4.64	0.6077 ± 0.1292	1450.99 ± 0.92	37.66 ± 0.84

M 영역 of a dried teardrop				
m-가우시안 peak	정상 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.59 ± 0.21	0.1435 ± 0.0133	1206.56 ± 0.06	10.41 ± 0.70
P2	5.36 ± 1.39	0.1918 ± 0.0307	1239.60 ± 0.74	25.94 ± 2.56
P3	21.07 ± 2.63	0.2831 ± 0.0090	1275.77 ± 0.50	69.85 ± 7.94
P4	6.97 ± 1.19	0.2105 ± 0.0321	1317.84 ± 0.71	31.09 ± 1.55
P5	4.61 ± 1.49	0.2051 ± 0.0554	1341.04 ± 0.50	20.81 ± 1.59
P6	2.49 ± 2.12	0.1128 ± 0.0123	1355.91 ± 9.08	21.10 ± 18.81
P7	1.27 ± 0.77	0.0559 ± 0.0137	1374.84 ± 11.30	22.85 ± 15.07
P8	3.05 ± 0.61	0.1222 ± 0.0145	1403.58 ± 2.11	23.30 ± 2.15
P9	0.77 ± 0.14	0.0621 ± 0.0058	1418.93 ± 0.93	11.58 ± 1.67
P10	24.86 ± 0.46	0.6298 ± 0.0096	1451.74 ± 0.11	37.09 ± 0.80
m-가우시안 peak	아데노바이러스 결막염 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.98 ± 1.45	0.1260 ± 0.0494	1205.69 ± 0.79	14.26 ± 7.57
P2	10.74 ± 4.54	0.2595 ± 0.0994	1241.89 ± 1.92	39.28 ± 13.90
P3	5.01 ± 2.93	0.1555 ± 0.0762	1274.86 ± 3.08	28.73 ± 9.87
P4	13.60 ± 6.66	0.2672 ± 0.1021	1313.51 ± 3.49	46.74 ± 18.54
P5	6.69 ± 4.78	0.2319 ± 0.1356	1342.72 ± 2.91	24.91 ± 9.53
P6	1.66 ± 1.65	0.0826 ± 0.0658	1358.46 ± 1.06	15.17 ± 8.31
P7	3.97 ± 1.83	0.1262 ± 0.0529	1388.31 ± 5.90	29.26 ± 9.78
P8	1.84 ± 0.97	0.0900 ± 0.0411	1407.25 ± 3.44	18.85 ± 6.24
P9	0.82 ± 0.58	0.0638 ± 0.0310	1419.14 ± 1.169	11.35 ± 4.33
P10	21.42 ± 8.14	0.5279 ± 0.2005	1451.31 ± 0.77	38.17 ± 11.54

[0074]

T 영역 of a dried teardrop				
m-가우시안 peak	정상 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.43 ± 0.02	0.1205 ± 0.0004	1206.56 ± 0.02	11.17 ± 0.08
P2	8.56 ± 0.10	0.2559 ± 0.0018	1240.34 ± 0.06	31.41 ± 0.16
P3	8.84 ± 0.08	0.2137 ± 0.0005	1273.96 ± 0.05	38.85 ± 0.26
P4	9.38 ± 0.17	0.2385 ± 0.0015	1315.67 ± 0.20	36.97 ± 0.44
P5	4.21 ± 0.13	0.1830 ± 0.0024	1342.26 ± 0.02	21.62 ± 0.39
P6	1.42 ± 0.04	0.0986 ± 0.0020	1360.06 ± 0.06	13.54 ± 0.08
P7	2.56 ± 0.01	0.0720 ± 0.0006	1388.05 ± 0.10	33.39 ± 0.10
P8	2.31 ± 0.00	0.1024 ± 0.0005	1406.82 ± 0.08	21.20 ± 0.06
P9	0.75 ± 0.00	0.0617 ± 0.0000	1419.73 ± 0.08	11.42 ± 0.08
P10	22.11 ± 0.05	0.5482 ± 0.0017	1452.16 ± 0.03	37.89 ± 0.03
m-가우시안 peak	아데노바이러스 결막염 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.53 ± 0.26	0.1338 ± 0.0108	1206.72 ± 0.51	10.67 ± 1.12
P2	9.08 ± 3.29	0.2666 ± 0.0732	1242.24 ± 1.19	31.18 ± 4.16
P3	11.17 ± 11.05	0.2066 ± 0.0703	1275.36 ± 2.44	44.54 ± 31.31
P4	14.07 ± 8.36	0.2522 ± 0.0816	1314.50 ± 0.48	48.43 ± 21.46
P5	6.34 ± 2.16	0.2417 ± 0.0579	1344.42 ± 3.49	24.15 ± 2.81
P6	0.64 ± 0.42	0.0558 ± 0.0263	1360.42 ± 0.43	10.07 ± 2.15
P7	3.08 ± 1.25	0.0952 ± 0.0236	1390.78 ± 4.46	29.65 ± 4.22
P8	1.27 ± 0.38	0.0673 ± 0.0143	1408.75 ± 1.01	17.58 ± 1.42
P9	0.51 ± 0.08	0.0514 ± 0.0058	1419.87 ± 0.18	9.35 ± 0.46
P10	25.07 ± 1.23	0.6279 ± 0.0339	1452.46 ± 0.61	37.52 ± 0.24

R 영역 of a dried teardrop				
m-가우시안 peak	정상 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.61 ± 0.29	0.1286 ± 0.0160	1206.19 ± 0.40	11.71± 0.69
P2	10.00 ± 4.76	0.2659 ± 0.0908	1240.49 ± 1.67	34.07 ± 4.81
P3	7.14 ± 1.90	0.1833 ± 0.0256	1273.59 ± 1.32	36.37 ± 7.58
P4	13.61 ± 4.64	0.2835 ± 0.0465	1316.58 ± 2.03	44.17 ± 8.83
P5	3.76 ± 1.89	0.1693 ± 0.0632	1342.20 ± 1.13	20.12 ± 2.56
P6	2.01 ± 1.41	0.1147 ± 0.0610	1358.89 ± 1.69	15.76 ± 3.19
P7	2.56 ± 0.77	0.0762 ± 0.0182	1390.01 ± 4.29	30.98 ± 3.69
P8	1.60 ± 0.60	0.0771 ± 0.0208	1407.82 ± 1.25	19.07 ± 2.41
P9	0.58 ± 0.18	0.0514 ± 0.0110	1419.51 ± 0.43	10.34 ± 1.21
P10	22.21 ± 3.72	0.5586 ± 0.0899	1451.90 ± 0.62	37.32 ± 0.58
m-가우시안 peak	아데노바이러스 결막염 그룹			
	Area	Intensity	Raman shift (cm^{-1})	Half-width (cm^{-1})
P1	1.80 ± 0.39	0.1472 ± 0.0209	1205.93 ± 0.62	11.41 ± 0.95
P2	5.04 ± 1.92	0.1667 ± 0.0510	1237.58 ± 1.90	27.89 ± 2.76
P3	16.46 ± 6.11	0.2353 ± 0.0363	1275.33 ± 0.57	64.44 ± 18.20
P4	7.45 ± 2.52	0.2176 ± 0.0481	1316.50 ± 1.06	31.47 ± 4.35
P5	5.92 ± 1.82	0.2374 ± 0.0424	1340.81 ± 0.89	22.99 ± 3.32
P6	1.18 ± 0.31	0.0878 ± 0.0183	1359.63 ± 0.59	12.50 ± 1.40
P7	2.15 ± 0.63	0.0677 ± 0.0141	1391.77 ± 6.50	30.00 ± 7.24
P8	1.19 ± 0.76	0.0590 ± 0.0235	1409.21 ± 3.64	17.93 ± 4.92
P9	0.55 ± 0.24	0.0522 ± 0.0126	1420.05 ± 0.84	9.64 ± 2.14
P10	21.47 ± 2.23	0.5661 ± 0.0469	1451.19 ± 0.81	35.58 ± 0.93

[0075]

[0076] 낮은 파수로부터 2번째 가우시안 함수(1242 cm^{-1}에서 아미드 III β-시트), 3번째 함수(1275 cm^{-1}에서 아미드 III α-나선), 5번째 함수(1342 cm^{-1}에서 C-H 변형) 및 10번째 함수(1448 cm^{-1}에서 C-H 변형)의 4개 가우시안 함수를 눈물 시료 중의 단백질 분석을 위한 피크로 선택하였다.

[0077] 선택된 가우시안 함수로 이루어진 MGP 바이오마커의 특성을 하기 표 9에 정리하였다. 비감염자 눈물의 경우 C 영역으로부터 R 영역으로 진행함에 따라 아미드 III β-시트 및 C-H 변형이 2배 정도 증가하였으나, 아데노바이러스 결막염 환자의 눈물의 경우 반대의 패턴을 나타내었다. 이러한 변화는 비감염자군에서 아미드 III α-나선의 유의한 감소($p<0.001$)와 아데노바이러스 결막염 환자군에서는 유의한 증가($p<0.01$)를 나타내었으나, 1448 cm^{-1}에서 C-H 변형은 2개 군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

표 9

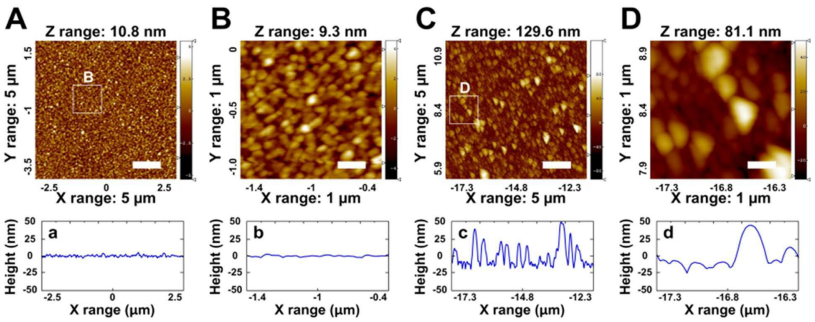
MGP 바이오마커	정상 그룹(cm^{-1}) (intensity feature) / (area feature)				아데노바이러스 결막염 그룹(cm^{-1}) (intensity feature) / (area feature)			
	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역	C 영역	M 영역	T 영역	R 영역
Amide Ⅲ β-sheet	1241	1240	1240	1240	1243	1242	1242	1238
	(0.13)	(0.19)	(0.26)	(0.27)	(0.33)	(0.26)	(0.27)	(0.17)
	(4.40)	(5.36)	(8.56)	(10.00)	(13.78)	(10.74)	(9.08)	(5.04)
Amide Ⅲ α-helix	1275	1276	1274	1274	1277	1275	1275	1275
	(0.25)	(0.28)	(0.21)	(0.18)	(0.21)	(0.16)	(0.21)	(0.24)
	(23.30)	(21.07)	(8.84)	(7.14)	(6.50)	(5.01)	(11.17)	(16.46)
C–H deformation	1341	1341	1342	1342	1342	1343	1344	1341
	(0.27)	(0.21)	(0.18)	(0.17)	(0.38)	(0.23)	(0.24)	(0.24)
	(7.24)	(4.61)	(4.21)	(3.76)	(11.70)	(6.69)	(6.34)	(5.92)
C–H deformation	1454	1452	1452	1452	1451	1451	1452	1451
	(0.74)	(0.63)	(0.55)	(0.56)	(0.61)	(0.53)	(0.63)	(0.57)
	(27.13)	(24.86)	(22.11)	(22.21)	(24.29)	(21.42)	(25.07)	(21.47)

[0078]

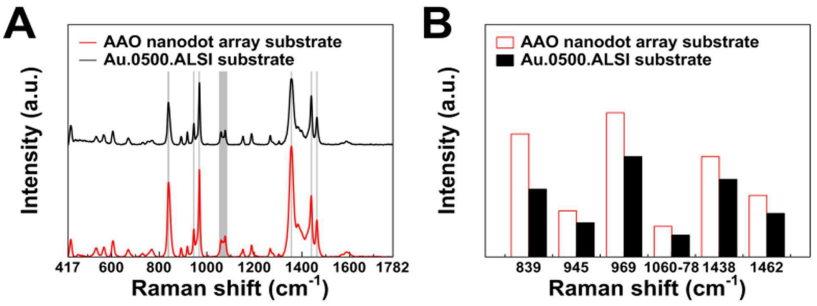
[0079] 최종적으로, 다중 가우시안 모델로부터 분리된 각각의 가우시안 함수는 비감염자 및 아데노바이러스 결막염 환자로부터 채취한 시료의 차이를 명확히 보여주었으며, 이는 가우시안 세분화(segmentation) 기술에 의해 결정된 MGP 마커가 아데노바이러스 감염 여부를 정성 및 정량적으로 모니터링하는데 사용될 수 있음을 나타내는 것이다. 따라서, 본 발명의 바이러스 감염 검출방법 및 시스템은 눈물시료를 이용하여 바이러스 감염에 의한 안과적 질환을 진단하는 것뿐만 아니라 침, 땀 등 다른 체액시료를 이용한 바이러스 감염 진단에도 활용될 수 있을 것이다.

도면

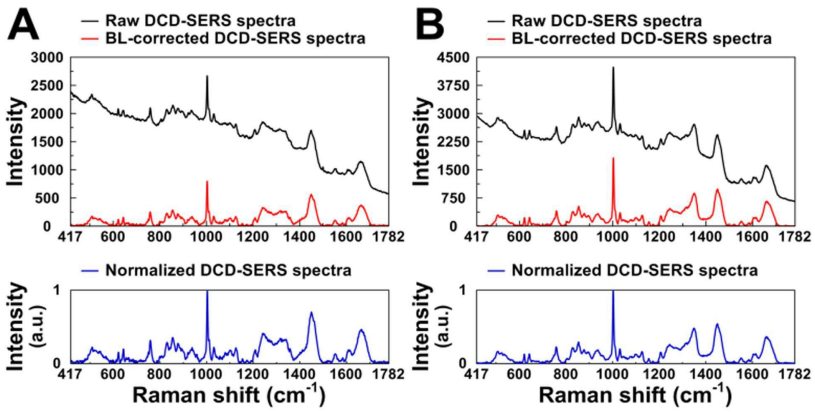
도면1



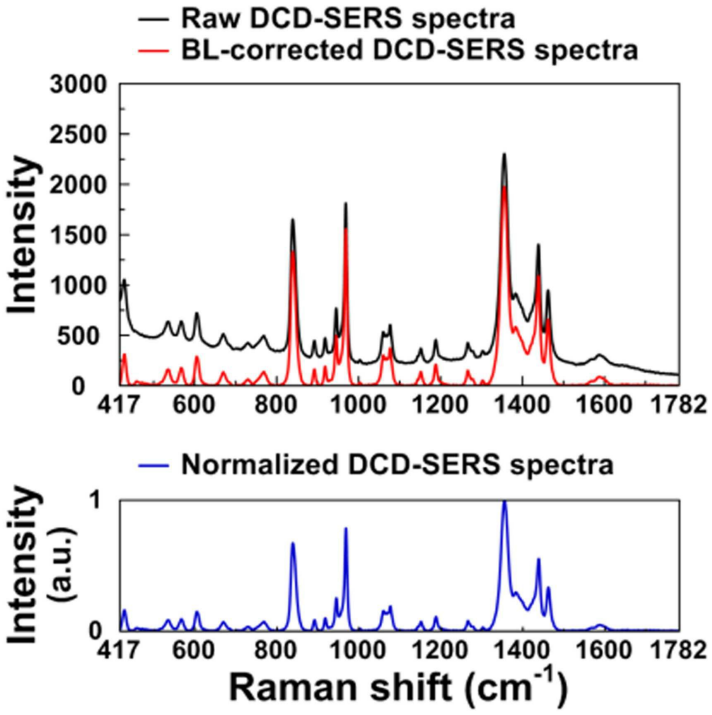
도면2



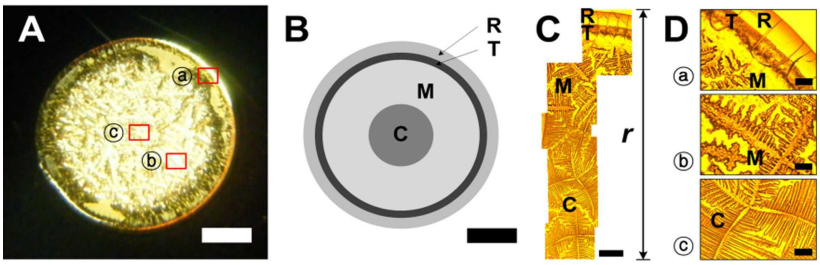
도면3


A
Raw DCD-SERS spectra
BL-corrected DCD-SERS spectra
Intensity
Normalized DCD-SERS spectra
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
B
Raw DCD-SERS spectra
BL-corrected DCD-SERS spectra
Intensity
Normalized DCD-SERS spectra
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)

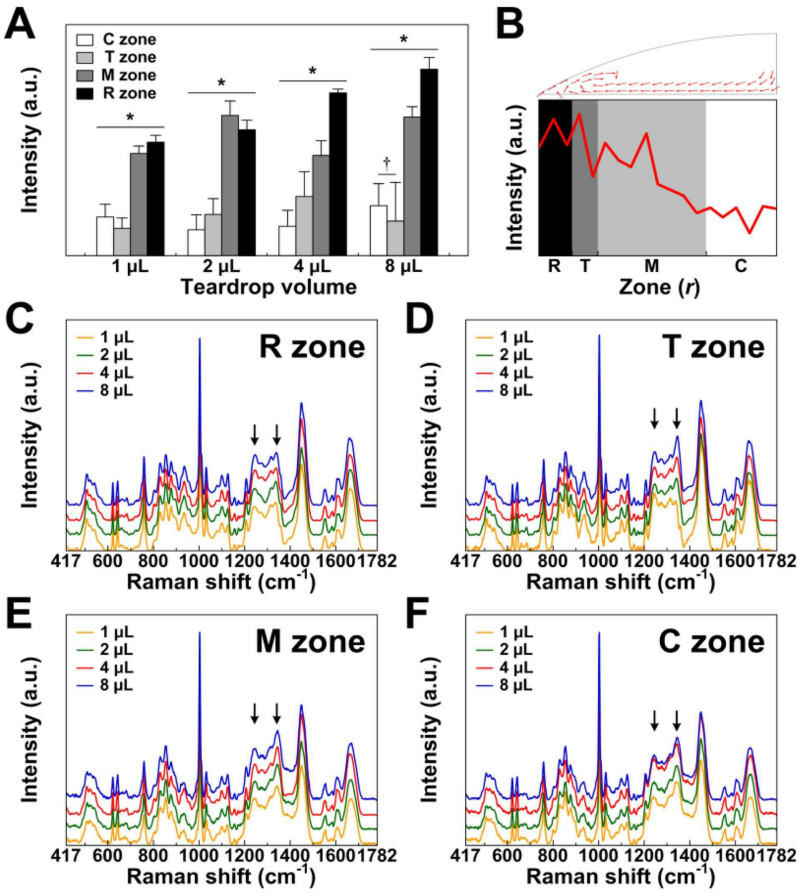
도면4


Raw DCD-SERS spectra
BL-corrected DCD-SERS spectra
Intensity
Normalized DCD-SERS spectra
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)

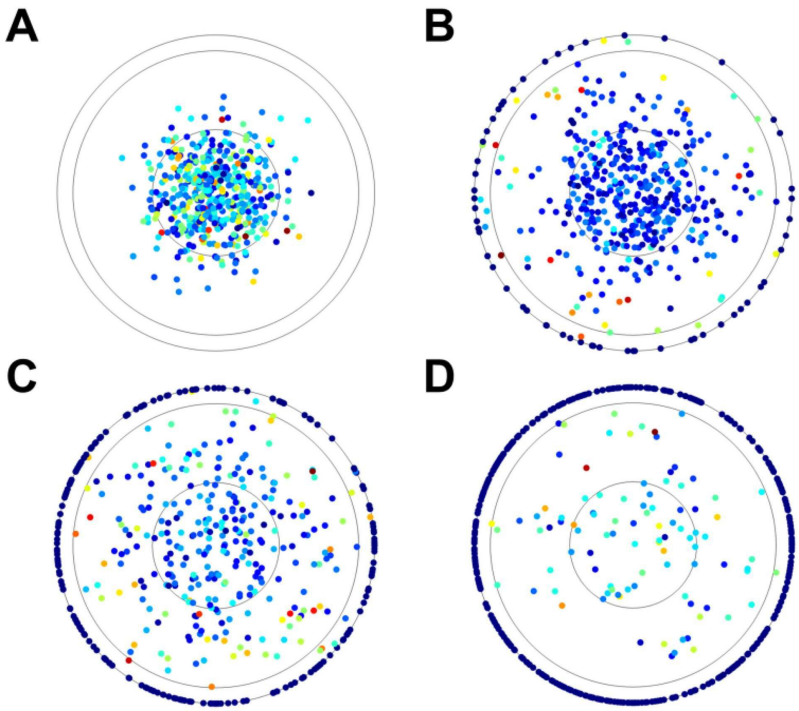
도면5


A
B
R
T
M
C
C
R
T
M
r
C
D
T
R
M
M
C

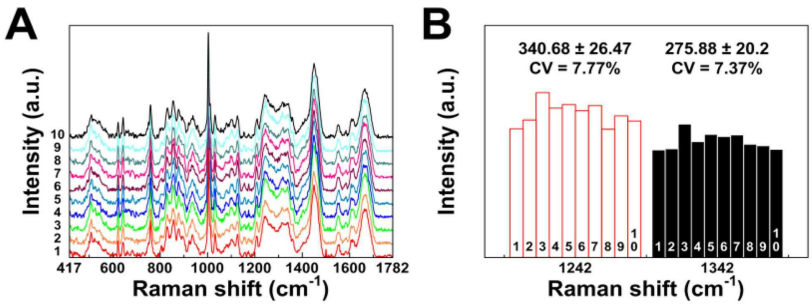
도면6


A
C zone
T zone
M zone
R zone
Intensity (a.u.)
1 μL
2 μL
4 μL
8 μL
Teardrop volume
B
Intensity (a.u.)
R T M C
Zone (r)
C
R zone
1 μL
2 μL
4 μL
8 μL
Intensity (a.u.)
417 600 800 1000 1200 1400 1600 1782
Raman shift (cm-1)
D
T zone
E
M zone
F
C zone

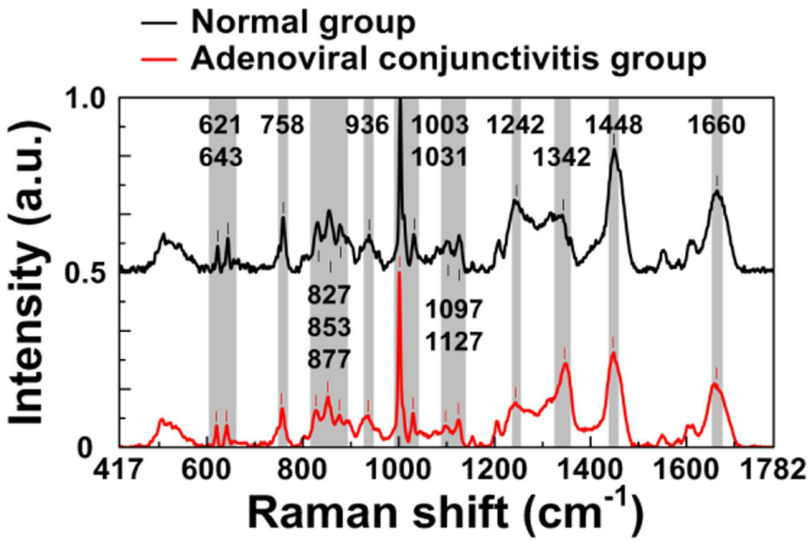
도면7


A
B
C
D

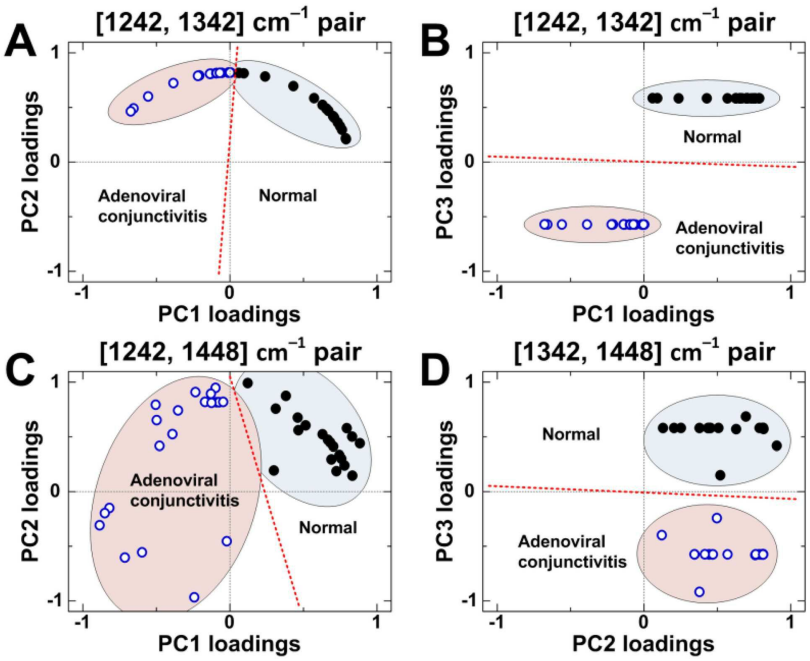
도면8


A
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
B
340.68 ± 26.47
CV = 7.77%
275.88 ± 20.2
CV = 7.37%
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)

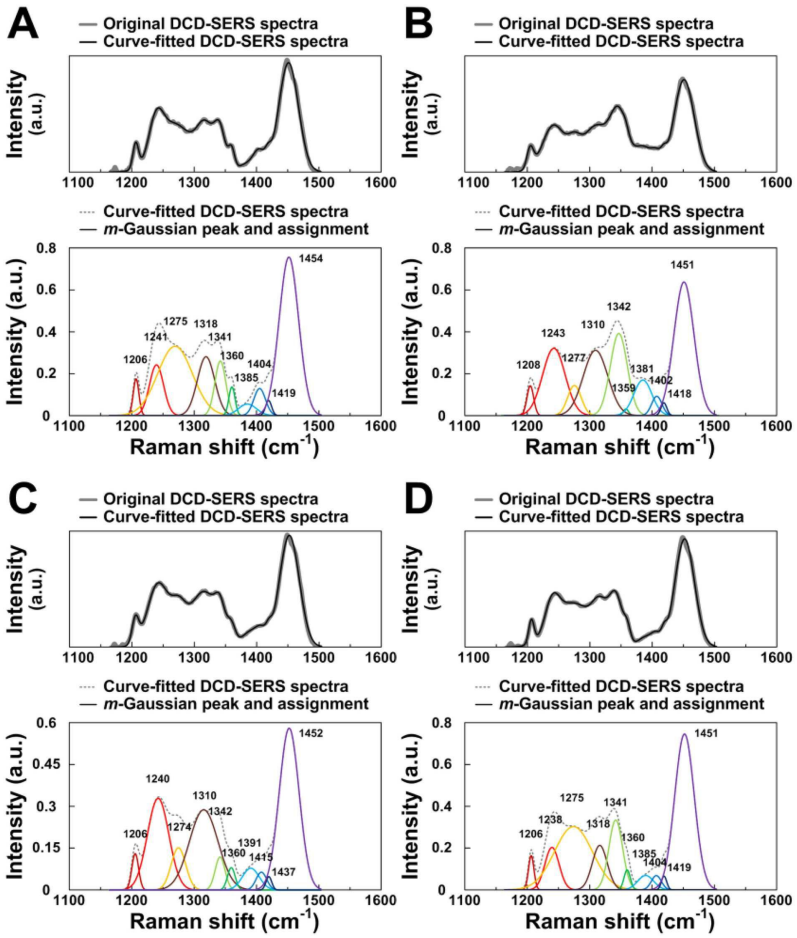
도면9


Normal group
Adenoviral conjunctivitis group
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
621
643
758
827
853
877
936
1003
1031
1097
1127
1242
1342
1448
1660

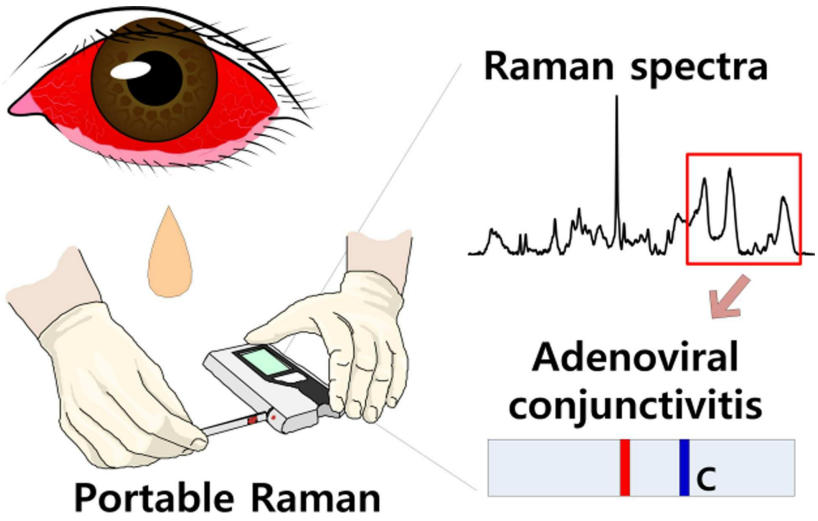
도면10


A
[1242, 1342] cm−1 pair
PC2 loadings
PC1 loadings
Adenoviral conjunctivitis
Normal
B
[1242, 1342] cm−1 pair
PC3 loadnings
PC1 loadings
Normal
Adenoviral conjunctivitis
C
[1242, 1448] cm−1 pair
PC2 loadings
PC1 loadings
Adenoviral conjunctivitis
Normal
D
[1342, 1448] cm−1 pair
PC3 loadings
PC2 loadings
Normal
Adenoviral conjunctivitis

도면11


A
B
C
D
Original DCD-SERS spectra
Curve-fitted DCD-SERS spectra
m-Gaussian peak and assignment
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
1206
1241
1275
1318
1341
1360
1385
1404
1419
1454
1208
1243
1277
1310
1342
1359
1381
1402
1418
1451
1206
1240
1274
1310
1342
1360
1391
1415
1437
1452
1206
1238
1275
1318
1341
1360
1385
1404
1419
1451

도면12


Raman spectra
Adenoviral conjunctivitis
C
Portable Raman