(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 1 월 9 일 (09.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/009507 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/18 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008241

(22) 국제출원일: 2019 년 7 월 4 일 (04.07.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0077796 2018 년 7 월 4 일 (04.07.2018) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 용동은 (**YONG, Dong Eun**); 06292 서울시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705, Seoul (KR). 우위제이마나장 다마센 (**UWIZEYIMANA, Jean Damascene**); 키갈리시티 가켄케 디스트릭트, 룰리병원, Kigali city (RW). 변정현 (**BYUN, Jung Hyun**); 04191 서울시 마포구 백범로 239, 신공덕 이편한세상 103-1204, Seoul (KR).

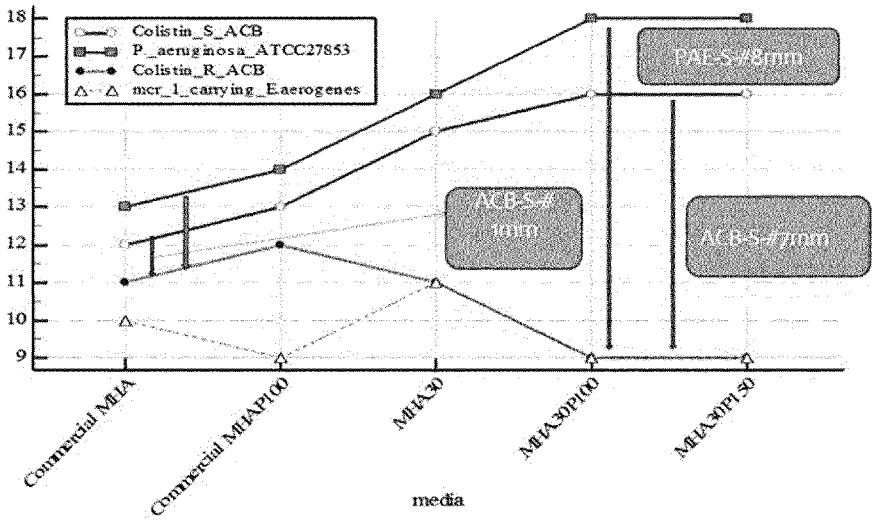
(74) 대리인: 이재영 (**LEE, Jae Young**); 06151 서울시 강남구 테헤란로43길 14 청수빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

(54) **Title:** MEDIUM FOR DISK DIFFUSION METHOD TO EVALUATE ANTIBIOTIC SENSITIVITY

(54) **발명의 명칭:** 항생제 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지



(57) **Abstract:** The present invention relates to a medium composition for use in a disk diffusion method to evaluate sensitivity to antibiotics and, more particularly, to a medium composition for a disk diffusion method, the composition comprising 1.5 to 10 g/L of agar; and at least one of 50 to 200 μg/ml of protamine or a salt thereof and 5 to 500 μg/ml of guanidine or a salt thereof.

(57) **요약서:** 본 발명은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위하여 디스크 확산법(disk diffusion method)에 사용될 수 있는 배지 조성물로, 보다 상세하게는 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및 프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 μg/ml 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 μg/ml 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/009507 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 항생제 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지

기술분야

[1] 본 발명은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위하여 디스크 확산법(disk diffusion method)에 사용될 수 있는 배지 조성물과, 이를 이용하여 디스크 확산법에 의해 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 일반적으로 시편의 항균력을 측정하는 방법으로는 콜로니 계수 기법(colony counting method)과 디스크 확산법(disk diffusion method)이 사용된다. 콜로니 계수 기법은 일정 시간 동안 시편과 반응한 미생물 용액을 영양한천배지(nutrient agar)에 도말한 후, 일정 시간 동안 미생물을 성장시켜, 성장된 미생물 군집 계수를 통해 시편의 항균력을 측정하는 방법으로, 정량적인 측정 결과를 얻을 수 있다.

[3] 반면 디스크 확산법은 일정량의 미생물이 도말되어 있는 영양한천배지에 시편을 올려놓은 후, 일정 시간 동안 미생물을 성장시켜, 시편의 영향으로 시편 주위에 생기는 미생물 성장 억제 지대(inhibition zone)의 크기를 측정하는 방법으로, 시편의 정성적인 항균력 결과를 얻을 수 있다.

[4] 구체적으로, 콜로니 계수 기법의 경우, 정량적인 항균력 측정 결과를 얻을 수 있어, 다양한 연구 분야에서 많이 사용되고 있지만, 측정 가능한 미생물 군집 계수를 얻기 위해서는 다양한 희석비를 이용한 반복 실험이 요구되며, 미생물과 시편을 반응시키는 시간과 반응이 끝난 미생물을 영양한천배지에서 성장시키는 시간이 각각 요구되어 시간적, 비용적인 측면에서 단점을 가지고 있다.

[5] 한편, 디스크 확산법의 경우, 일정량의 미생물을 영양한천배지에 도말한 후, 그 위에 시편을 올려놓고 미생물을 성장시키므로, 미생물과 시편의 반응이 미생물 성장과 함께 일어나 콜로니 계수 기법에 비해 시험 시간 및 시험 비용적인 측면에서 유리하다. 이 실험으로는 주로 미생물 성장 억제를 위한 항균제의 최소 농도 (MIC, minimal inhibitory concentration)를 얻는 연구에 한정되어 사용되고 있을 뿐이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 일 목적은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위하여 디스크 확산법(disk diffusion method)에 사용될 수 있는 배지 조성물을 제공하고자 한다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 배지 조성물을 이용하여 디스크 확산법에 의해 항생제 감수성을 평가하는 방법을 제공하고자 한다.

[8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터

당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[9] 최근 전세계적 과제로는 다제내성(multi-drug resistant, MDR) 그람 음성(gram-negative, GN) 박테리아 치료를 위한 약제 개발에 있어서 새로운 항생제를 개발하는 것이다. 한편, 콜리스틴(colistin)은 MDR GN 박테리아를 관리하기 위한 최후의 항생 수단에 해당한다. 폴리믹신 E(polymyxin E)로 알려진 콜리스틴은 양이온성, 사이클릭의 폴리펩티드 항생제 중 하나에 해당한다. 이러한 콜리스틴은 1947년 일본에서 토양 박테리아에 해당하는 패니바실러스 폴리믹사(Paenibacillus polymyxa subsp)에서 처음으로 분리된 뒤 1959년 임상적 용도로 사용되었으나, 신독성(nephrotoxicity) 및 신경독성(neurotoxicity)의 위험성으로 인하여 1980년대부터 그 사용이 중단되었다.

[10] 하지만 최근 여러 연구들에서 콜리스틴 황산염(colistin sulfate)을 정맥으로 주사하는 경우 안전하고, MDR GN 병원균의 심각한 감염을 관리할 수 있다고 밝혀졌다. 이에, 1990년대 중반부터 폴리믹신을 다시 임상적으로 사용하기에 이르렀고, 그 중에서도 특히 콜리스틴은 빠른 살균 효과와, MDR GN 병원균에 대한 넓은 범주의 작용, 그리고 대부분의 MDR GN 박테리아에 대한 새로운 항생제의 부족으로 인하여 관심이 집중되고 있다. 콜리스틴은 클렙시엘라 종(Klebsiella spp.), 엔테로박터 종(Enterobacter spp.), 에스케리키아 콜리(Escherichia coli), 시트로박터 종(Citrobacter spp.), 살모넬라 종(Salmonella spp.) 및 쉬겔라 종(Shigella spp.)과 같은 MDR 균주에 대하여 특이적 활성을 나타내며, 그 외에도 스테노트르포모나스 말토필리아(Stenotrophomonas maltophilia), 아시네토박터 바우만니(Acinetobacter baumannii) 및 슈도모나스 에로지노사(Pseudomonas aeruginosa)와 같은 GN 박테리아에 대하여 활성을 나타내며, 낮은 내성 수준을 보인다. 일반적으로 폴리믹신에 대한 전세계적 내성 비율은 10% 미만이지만, 계속하여 증가하고 있는 추세이다.

[11] 콜리스틴의 임상적 사용 기간이 상당히 길었음에도 불구하고, 아직까지 콜리스틴에 대한 감수성을 평가할 수 있는 적절한 방법을 찾는 것이 과제로 남겨져 있다. 지난 몇 년간 콜리스틴의 사용이 급격히 증가함에 따라, 임상의가 치료학적으로 적절한 결정을 내릴 수 있도록, 보다 빠르고, 정확하며, 신뢰할 수 있는 인-비트로(in vitro) 항생제 감수성 검사(antimicrobial susceptibility testing, AST) 방법에 대한 요구가 더욱 커지고 있다.

[12] 디스크 확산법은 많은 임상적 연구소에서 일반적으로 사용되고 있지만, MIC-기반 방법과 비교할 때, 콜리스틴의 배지로의 확산력이 떨어져 감수성 평가의 정확도가 매우 떨어지는 문제점이 있다. 그 외에 사용되는 방법으로, Vitek2, E-test 및 아가 희석법(agar dilution) 등이 있지만 이들 역시 신뢰도가 떨어지는 단점이 있다. 콜리스틴 AST는 이미 임상적 미생물 연구실에서 정형화되어 사용되고 있으므로, 연구자들에게 디스크 확산법의 수행 조건을

변경하는 것은 어려운 사정이 있다.

[13] 본 발명의 발명자들은 상기한 문제점을 해결하기 위하여 지속적인 연구를 수행하여 폴리믹신, 그 중에서도 특히 콜리스틴에 대한 감수성을 예측하기 위한 디스크 확산법의 정확도를 높일 수 있는 배지의 조성을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.

[14]

[15] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및

[16] 프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 ㎍/ml 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 ㎍/ml 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물에 관한 것이다.

[17] 본 발명에서 상기 배지 조성물은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지 조성물일 수 있다.

[18] 본 발명에서 상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다. 본 발명에서 상기 "폴리믹신(polymyxin)"은 그람 음성 박테리아 감염을 치료하기 위한 항생제로, 패니바실러스 폴리믹사(Paenibacillus polymyxa)와 같은 그람 양성의 박테리아로부터 생산된다. 이러한 폴리믹신은 그람 음성 박테리아 세포 외막의 지질다당류(lipopolysaccharide)에 결합한 뒤 세포 외막 및 내막을 파괴하여 항생 효과를 발휘한다.

[19] 본 발명의 배지 조성물에서 상기 아가는 1.5 내지 10 g/L의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1.7 내지 8.5 g/L, 또는 3.4 내지 6.8 g/L, 또는 4.0 내지 6.0 g/L 또는 4.5 내지 5.5 g/L의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 아가의 함량이 1.5 g/L 미만인 경우 배지가 충분히 고형화되지 못하여 디스크 확산법에 적합하지 않고, 아가의 함량이 10 g/L를 초과하는 경우 항생제가 아가 내로 확산되지 못하여 성장 억제 영역(inhibition zone)이 작게 형성됨에 따라 항생제 감수성 평가의 정확도가 현저히 떨어지게 된다.

[20] 또한, 본 발명의 배지 조성물은 프로타민 또는 이의 염; 및 구아니딘 또는 이의 염; 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[21] 본 발명에서 상기 프로타민 염으로는 프로타민 황산염(protamine sulfate)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[22] 본 발명에서 상기 구아니딘 염으로는 구아니딘 하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride)인 것이 바람직하다.

[23] 본 발명의 배지 조성물에서 상기 프로타민 또는 이의 염은 50 내지 200 ㎍/ml의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 50 내지 150 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 80 내지 120 ㎍/ml의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 프로타민 또는 이의 염의 함량이 50 ㎍/ml 미만인 경우 항생제의 확산력 증진 효과가 미미하고, 프로타민 또는 이의 염의 함량이 200 ㎍/ml를 초과하는 경우 프로타민 또는 이의 염으로 인하여 박테리아의 성장이 억제되거나 사멸하게 됨에 따라 항생제

감수성을 평가함에 있어 정확도가 현저히 떨어지게 된다.

[24] 본 발명의 배지 조성물에서 상기 구아니딘 또는 이의 염은 5 내지 500㎍/ml의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 300 ㎍/ml 또는 25 내지 100 ㎍/ml의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 구아니딘 또는 이의 염의 함량이 5 ㎍/ml 미만인 경우 항생제의 확산력 증진 효과가 미미하고, 구아니딘 또는 이의 염의 함량이 500 ㎍/ml를 초과하는 경우 구아니딘 또는 이의 염으로 인하여 박테리아의 성장이 억제되거나 사멸하게 됨에 따라 항생제 감수성을 평가함에 있어 정확도가 현저히 떨어지게 된다.

[25] 본 발명의 배지 조성물은 육추출물(beef extract)을 1.5 내지 2.5 g/L의 양으로, 바람직하게는 1.75 내지 2.25 g/L의 양으로 더 포함할 수 있다.

[26] 본 발명의 배지 조성물은 카제인 가수분해물(casein hydrolysate)을 15 내지 20 g/L의 양으로, 바람직하게는 17 내지 18 g/L의 양으로 더 포함할 수 있다.

[27] 본 발명의 배지 조성물은 전분을 1 내지 2 g/L의 양으로, 바람직하게는 1.25 내지 1.75 g/L의 양으로 더 포함할 수 있다.

[28] 본 발명의 배지 조성물은 잔부 용매, 바람직하게는 물을 포함할 수 있다.

[29] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 배지 조성물은 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L, 프로타민 또는 이의 염은 50 내지 200㎍/ml; 및 구아니딘 또는 이의 염은 5 내지 500㎍/ml; 중 적어도 하나, 육추출물(beef extract) 1.5 내지 2.5 g/L, 카제인 가수분해물(casein hydrolysate) 15 내지 20 g/L, 전분 1 내지 2 g/L 및 잔부 물을 포함할 수 있다.

[30] 본 발명의 배지 조성물은 25 ℃의 상온에서 pH가 7 내지 7.5일 수 있고, 바람직하게는 7.2 내지 7.4일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[31]

[32] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물에 목적하는 균주를 도말하는 단계; 및

[33] 상기 균주가 도말된 배지 조성물 상에 항생제를 포함하는 시편을 위치시키는 단계를 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

[34] 본 발명에서 상기 배지 조성물은 배양 플레이트에 담지하여 준비할 수 있다. 본 발명에서 상기 배양 플레이트의 재질 및 형상을 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 폴리스티렌(polystyrene) 또는 유리 재질의 원형 플레이트일 수 있다.

[35] 본 발명에서는 상기 목적하는 균주는 항생제에 대한 감수성을 예측하기 위한 균주로, 그람 양성(Gram positive) 박테리아 또는 그람 음성(Gram negative) 박테리아일 수 있으나, 균주의 구체적인 종류는 특별히 제한하지 않는다.

[36] 본 발명에서 상기 시편의 재질, 크기 및 형상은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 종이 또는 셀룰로오스 재질일 수 있고, 직경이 5 내지 20 mm인 디스크(disk) 형상일 수 있다. 본 발명에서 상기 시편으로는 시중에 판매되는 디스크로, 직경이 6 mm, 9 mm 또는 13 mm인 Whatman 종이 디스크 (Whatman Ltd.)를 사용하거나, Oxoid 사의 블랭크 디스크(blank disk)를 사용할 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다.

[37] 본 발명에서 상기 시편을 항생제 및 용매를 포함하는 용액에 침지시킬 수 있다.

[38] 본 발명에서 상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다.

[39] 본 발명에서 상기 용매는 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸에테르, 부틸렌글리콜, 헥산 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[40] 본 발명에서 상기 용액 내 항생제의 농도는 특별히 제한되지 않으며, 사용되는 항생제의 종류, 항생제 감수성을 측정하는 방법에 따라 달라질 수 있으나, 예를 들면 0.1 내지 1000 ㎍/ml, 또는 0.5 내지 100 ㎍/ml의 양으로 포함될 수 있다.

[41] 본 발명에서는 상기 시편을 용액 내에 침지시켜 20 내지 25 ℃의 상온에서 10분 이상, 15분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 12시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 4일 이상, 8일 이상, 15일 이상 또는 30일 이상 유지시킬 수 있다.

[42] 본 발명에서는 상기 용액에 침지시킨 시편을 상온에서 10분 이상, 15분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 12시간 이상, 14시간 이상, 16시간 이상, 18시간 이상, 20시간 이상, 22시간 이상 또는 24시간 이상 건조시키는 단계를 수행할 수 있다.

[43] 본 발명에서는 필요에 따라, 상기 배지 조성물 상에 시편을 위치시킨 뒤 항생제의 전-확산(pre-diffusion)을 위하여 4 ℃에서 1분 내지 24시간, 10분 내지 12시간, 1시간 내지 6시간, 또는 1시간 내지 3시간 동안 유지시키는 단계를 수행할 수 있다.

[44] 또한, 본 발명에서는 상기 배지 조성물 상에 시편을 위치시킨 뒤 목적하는 균주를 배양하는 단계를 수행할 수 있다. 이때 배양 조건은 특별히 제한하지 않으며, 목적하는 균주의 종류에 따라 적절히 조절할 수 있으나, 예를 들면 5 부피% CO_2, 37 ℃의 온도 하에서 10분 이상, 15분 이상, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 12시간 이상, 14시간 이상, 16시간 이상, 18시간 이상, 20시간 이상, 22시간 이상, 24시간 이상, 48시간 이상, 56시간 이상, 64시간 이상, 72시간 이상, 또는 80시간 이상 수행할 수 있다.

[45] 본 발명에서 상기 균주의 배양 후 상기 시편의 주변에 형성된 미생물 성장 억제 영역(inhibition zone)의 크기, 바람직하게는 직경을 측정하여 항생제에 대한 목적하는 균주의 감수성을 측정하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.

[46] 본 발명에서 상기 "성장 억제 영역(inhibition zone)"은 시편, 즉 종이 디스크로부터 확산된 항생제가 박테리아의 성장을 억제하여, 상기 디스크 주변에 형성되는 맑은 영역(clear region)에 해당한다. 일반적으로 성장 억제 영역의 크기는 박테리아의 항생제에 대한 감수성과 직접적 관계가 있다: 성장 억제 영역이 클수록 박테리아의 항생제에 대한 감수성이 큰 것을 의미한다. 단,

상기 성장 억제 영역의 크기는 균주의 종류, 디스크에 침지된 항생제의 양 및 배양 조건에 따라 달라질 수 있다.

[47] 본 발명에서 상기 감수성의 측정 대상이 되는 항생제로는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다.

발명의 효과

[48] 본 발명에서 제공하는 배지 조성물을 사용하는 경우, 디스크 확산법을 이용하여 항생제, 바람직하게는 폴리믹신, 보다 바람직하게는 콜리스틴에 대한 감수성 측정 시 디스크로부터 배지로의 항생제의 확산력을 높여 감수성 측정의 정확도를 보다 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[49] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 일반 뮐러-힌턴 아가 배지; 일반 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 첨가한 배지; 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정한 뮐러-힌턴 아가 배지; 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정한 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 첨가한 배지; 및 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정한 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 150 ㎍/ml의 농도로 첨가한 배지;에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터(ACB) 균주, 슈도모나스 에로지노사(Pseudomonas aeruginosa) ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(Enterobacter aerogenes) 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 직경의 크기(mm)를 나타낸 것이다.

[50] 도 2의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터(ACB) 균주(N=2), 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 직경의 크기(mm)를 나타낸 것이다.

[51] 도 2의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터(ACB) 균주(N=2), 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 직경의 크기(mm)를 나타낸 것이다.

[52] 도 3의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[53] 도 3의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 ㎍/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[54] 도 4의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(Enterobacter aerogenes)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[55] 도 4의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(Enterobacter aerogenes)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[56] 도 5의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 아시네토박터(Acinetobacter, ACB)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[57] 도 5의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 아시네토박터(ACB)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[58] 도 6의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 아시네토박터(ACB)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[59] 도 6의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 아시네토박터(ACB)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[60] 도 7의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 실시예 4에서, 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 얻어진 디스크 확산법의 결과와 MIC 결과를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

[61] 도 8은 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 500 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터 바우만니(ABA) 균주, 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pnemoniae; KPN) 균주 및 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 슈도모나스 에로지노사(Pseudomonas aeruginosa; PAE) 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[62] 도 9는 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 50 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터 바우만니(ABA) 균주, 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 클렙시엘라 뉴모니아(KPN) 균주 및

콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 슈도모나스 에로지노사(PAE) 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

[63] 도 10은 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 5 μg/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터 바우만니(ABA) 균주, 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 클렙시엘라 뉴모니아(KPN) 균주 및 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 슈도모나스 에로지노사(PAE) 균주를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[64] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및

[65] 프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 μg/ml 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 μg/ml 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물에 관한 것이다.

[66] 본 발명에서 상기 배지 조성물은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지 조성물일 수 있다.

[67]

[68] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물에 목적하는 균주를 도말하는 단계; 및

[69] 상기 균주가 도말된 배지 조성물 상에 항생제를 포함하는 시편을 위치시키는 단계를 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

[70] 본 발명에서 상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[71] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[72]

[73] **실시예**

[74]

[75] [실시예 1]

[76] 뮐러-힌턴 액체 배지(Mueller-Hinton broth) (BD Diagnostic)에서 아가 입자(BD Diagnostic, Sparks, MD, USA)의 농도를 17 g/L를 100%로 하여 30%까지 10%씩 감소시키며 MHA 배지의 변형을 수행하였다. 이와 같이 변형된 MHA에 프로타민(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 100 μg/ml의 농도로 첨가하여 고형화시킨 뒤 상기 배지 표면에 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 칼코아세티커스-바우만니 복합체(Acinetobacter

calcoaceticus-baumannii complex; ACB) 균주, 슈도모나스 에로지노사(Pseudomonas aeruginosa) ATCC27853 균주, 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli)* ATCC25922 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(Enterobacter aerogenes) 균주를 고르게 접종하고 그 위에 콜리스틴 디스크(colistin disk)를 놓았다. 이후 상기 콜리스틴 디스크 주변에 콜리스틴이 아가로 확산되어 투명하게 형성된 성장 억제 영역(colistin inhibition zone)의 직경을 측정하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[77]

[78] [표1]

균주		콜리스틴 억제 영역의 직경(mm)							
		100% 아가	90% 아가	80% 아가	70% 아가	60% 아가	50% 아가	40% 아가	30% 아가
콜리스틴내성	ACB-R	11	12	12	11	13	10	11	11
	mcr-1	10	10	9	10	10	11	10	11
콜리스틴감수성	ACB-S	12	12	12	13	13	13	15	16
	PAE	13	13	14	14	15	14	15	16
	ECO	13	13	14	14	14	14	14	16
평균		13	13	13	14	14	14	15	16
차이(S vs ACB-R)		2	1	1	3	1	4	4	5
차이(S vs mcr-1)		3	3	4	4	4	3	5	5

[79] 상기 표 1에서 보는 바와 같이, 아가의 농도를 17 g/L를 첨가하였을 때 보다 상기 아가 농도를 17 g/L의 30 내지 50%의 농도인 5.1 내지 8.5 g/L로 조정하였을 때 콜리스틴 내성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 유지되고 콜리스틴 감수성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[80]

[81] [실시예 2]

[82] 상기 실시예 1과 같이 뮐러-힌턴 액체 배지 (BD Diagnostic)에서 아가 입자(BD Diagnostic, Sparks, MD, USA)의 농도를 17 g/L의 30%인 5.1 g/L로

조정하고, 프로타민(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 150 μg/ml 또는 100 μg/ml의 농도로 첨가한 뒤 이를 고형화시켰다. 아가 및 프로타민의 농도에 따른 효과를 비교하기 위하여, 대조군으로 아가를 17 g/L의 농도로 포함하는 뮐러-힌턴 아가 배지(BD Diagnostic)와 이에 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 첨가한 배지를 준비하였다. 이렇게 준비된 각 배지의 표면에 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 칼코아세티커스-바우만니 복합체(ACB) 균주, 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주를 고르게 접종하고 그 위에 콜리스틴 디스크를 놓은 뒤 각 균주의 성장 여부와 상기 디스크 주변에 투명하게 형성된 성장 억제 영역의 직경을 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[83] 도 1에서 보는 바와 같이, 아가의 농도를 17 g/L를 첨가하였을 때 보다 상기 아가 농도를 17 g/L의 30%의 농도인 5.1 g/L의 양으로 조정하였을 때 콜리스틴 내성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 유지되고 콜리스틴 감수성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 프로타민을 첨가하자 상기 효과가 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[84]

[85] [실시예 3]

[86] 상기 실시예 1과 같이 뮐러-힌턴 액체 배지 (BD Diagnostic)에서 아가 입자(BD Diagnostic, Sparks, MD, USA)의 농도를 17 g/L(100%) 또는 이의 30%인 5.1 g/L로 조정하였다. 프로타민을 다양한 농도로 사용하면서, 박테리아의 성장은 방해하지 않으면서 디스크(disk)로부터 콜리스틴 확산을 증진시킬 수 있는 프로타민의 농도를 선정하기 위하여, 상기 배지에 프로타민(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 1 mg/ml, 700 μg/ml, 400 μg/ml, 300 μg/ml, 200 μg/ml, 150 μg/ml, 100 μg/ml 및 50 μg/ml의 농도로 첨가하였다. 이렇게 변형된 배지를 고형화시킨 뒤 상기 배지 표면에 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 칼코아세티커스-바우만니 복합체(ACB) 균주, 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주를 고르게 접종하고 그 위에 콜리스틴 디스크를 놓은 뒤 각 균주의 성장 여부와 상기 디스크 주변에 형성된 성장 억제 영역의 직경을 측정하여 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[87]

[88] [표2]

아가 농도	프로타민 농도	콜리스틴 내성 아시네토박터		콜리스틴 감수성 아시네토박터		PAE ATCC 27853		mcr-1	
		성장 여부	디스크 확산(㎜)	성장 여부	디스크 확산(㎜)	성장 여부	디스크 확산(㎜)	성장 여부	디스크 확산(㎜)
100%	1000㎍/㎖	성장 없음	6	성장 없음	6	일부 성장	18	성장 없음	6
	700㎍/㎖	성장 없음	6	성장	10	일부 성장	17	성장	10
	400㎍/㎖	성장	13	성장	14	성장	15	성장	8
	300㎍/㎖	성장	12	성장	13	성장	14	성장	10
	200㎍/㎖	성장	12	성장	12	성장	13	성장	9
	150㎍/㎖	성장	13	성장	13	성장	14	성장	10
	100㎍/㎖	성장	12	성장	12	성장	14	성장	9
	50㎍/㎖	성장	13	성장	13	성장	14	성장	9
30%	1000㎍/㎖	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6
	700㎍/㎖	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6
	400㎍/㎖	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6
	300㎍/㎖	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6	성장 없음	6
	200㎍/㎖	일부 성장	8	일부 성장	14	성장	20	성장	8
	150㎍/㎖	성장	10	성장	15	성장	18	성장	9
	100㎍/㎖	성장	11	성장	15	성장	18	성장	9
	50㎍/㎖	성장	13	성장	14	성장	17	성장	9

[89] 상기 표 2에서도, 아가를 17 g/L의 농도로 첨가하였을 때 보다 상기 아가를 17 g/L의 30%인 5.1 g/L의 농도로 조정하였을 때 콜리스틴 내성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 유지되고 콜리스틴 감수성 균주에서의 성장 억제 영역의 크기는 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[90] 또한, 프로타민은 50 내지 200 ㎍/ml의 농도, 바람직하게는 50 내지 150 ㎍/ml의 농도로 첨가하였을 때 각 균주의 성장은 저해되지 않으면서, 콜리스틴 감수성 균주에서 특이적으로 성장 억제 영역의 크기를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[91]

[92] [실시예 4]

[93] **I 단계**

[94] 1. mcr-1 생산자(producer)를 포함하는 임상적 격리(clinical isolates)에서

콜리스틴 감수성(susceptibility)을 식별(diskriminate)하기 위한 아가(agar) 농도 결정 및 프로타민의 첨가를 통한 적정화

[95] 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 칼코아세티커스-바우만니 복합체(ACB) 균주(N=2), 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주의 4종 박테리아 균주를 이용하여 아가의 조건을 결정하였다. 뮐러-힌턴 액체 배지 (BD Diagnostic)에서 아가 입자(BD Diagnostic, Sparks, MD, USA)의 농도를 17 g/L(100%) 또는 이의 30%인 5.1 g/L로 조정하였다. 변형된 MHA에 프로타민(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 100 μg/ml의 농도로 첨가하였다.

[96]

[97] 2. 결과

[98] 이렇게 준비된 각 배지의 표면에 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 칼코아세티커스-바우만니 복합체(ACB) 균주, 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853 균주 및 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스 균주를 고르게 접종하고 그 위에 콜리스틴 디스크를 놓은 뒤 각 균주의 성장 여부와 상기 디스크 주변에 투명하게 형성된 콜리스틴 억제 영역의 직경을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었고, 각 균주별 디스크 억제 영역의 사진을 촬영하여 그 결과를 도 3 내지 6에 나타내었다.

[99] 도 2 내지 6에서 보는 바와 같이, 아가 농도를 17 g/L로 하였을 때 보다, 아가 농도를 5.1 g/L로 조정하고 프로타민을 100 μg/ml의 농도로 첨가하였을 때 콜리스틴 내성 균주에서는 성장 억제 영역의 크기에 변화가 없었지만, 콜리스틴 감수성 균주에서는 성장 억제 영역의 직경이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 아가 농도를 일반적인 뮐러-힌턴 배지에 포함된 17 g/L의 30% 농도인 5.1 g/L의 농도로 확정하였다.

[100]

[101] **II 단계**

[102] 1. 변형된 뮐러-힌턴 배지에서 억제 영역의 직경과 MIC 사이의 상관관계의 결정

[103] 슈도모나스 에로지노사(*P. aeruginosa*) (*n*=27), ACB (*n* = 33), 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli)* ATCC25922, 슈도모나스 에로지노사(*P. aeruginosa*) ATCC27853, 및 *mcr-1*-수반 엔테로박터 에어로게네스(*E. aerogenes*)를 포함하는 63-GN 임상적 격리(clinical isolates)를 실험하였다. 콜리스틴 설페이트 염(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 및 폴리스티렌 96-웰 플레이트를 이용하여 63 균주에 대하여 브로쓰 마이크로-희석(broth micro-dilution, BMD)에 의해 콜리스틴 MICs를 결정하였다. MIC 및 디스크 확산(disk diffusion)은 2014 및 2018 CLSI 가이드라인에 따라 수행하였으며, 인간 오류 또는 오염을 방지하기 위하여 동일자에 수행하였다. MICs 결정 후, 적절한 아가 농도를 사용하여 각 균주에 대해 실험하였다. 보다 상세하게는 콜리스틴 내성 균주와 콜리스틴 감수성 균주

사이 콜리스틴 디스크 주변의 서로 구분된 억제 영역 직경을 보여주기 위하여 미리 결정된, 상업용 MHA(17 g/L 아가 농도); 30% 아가(5.1 g/L)를 포함하는 MHA(MHA30); 30% 아가(5.1 g/L) 및 100 μg/ml 프로타민을 포함하는 MHA(MHA30P);를 사용하였다.

[104] 프로타민에 증류수를 첨가하여 이를 완전히 용해시킨 뒤 오토클레이브(autoclave) 전에 MHA에 첨가하였다. 10mg 콜린 디스크(BD diagnostics)를 사용하여 35 ℃의 온도 및 5 부피% CO_2 조건 하에서 16 내지 18 시간 동안 배양하면서 콜린 디스크 확산 실험을 수행하였다. MHA30P는 상업적 MHA와 비교하여 상대적으로 부드러워, 접종 시 배지에 흠집이 생기는 것을 방지하기 위하여 주의를 요한다. 멸균 면봉을 3ml 및 부유액의 0.5 McFarland에 담갔다.

[105]

[106] 2. 분석 및 해석

[107] SPSS 21 (Version 21.0. Armonk, NY, USA)를 사용하여 통계적 분석을 수행하였다. MIC 결과를 사용하여 CLSI 2018에 억제 영역 직경의 중단점이 없는 것으로 디스크 확산의 결과를 해석하였다. 분석 과정에서 매우 중대한 오류 (very major errors, VMEs)는 false-susceptible 결과를 정의하였고, 주된 오류(major errors, MEs)는 false-resistant 결과를 정의하였다.

[108]

[109] 3. 결과

[110] 슈도모나스 에로지노사(*P. aeruginosa*) (*n*=27), ACB (*n* = 33), 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli)* ATCC25922, 슈도모나스 에로지노사(*P. aeruginosa*) ATCC27853 및 *mcr-1*-수반 엔테로박터 에어로게네스(*E. aerogenes*)를 포함하는 63-GN 임상적 격리(clinical isolates)를 이용하여 콜리스틴 확산과 MIC 일치율을 실험하였다. 그 결과, 도 7a 내지 7f에서 보는 바와 같이, 슈도모나스 에로지노사 및 아시네토박터 균주의 경우 MIC와 디스크 확산의 내성 일치율이 100%에 해당하는 것을 확인할 수 있었다. 콜리스틴에 감수성 있는 균주의 경우도 MIC와 디스크 확산의 일치율이 대략 97.8% 정도로 높은 일치율을 보였다.

[111] 본 발명에서 아가가 5.1 g/L의 농도로 포함되고, 프로타민이 100 ㎍/ml의 농도로 포함되는 배지 조성물을 사용하는 경우 콜리스틴의 아가로의 확산 능력을 높이며, 슈도모나스 에로지노사 및 아시네토박터 종과 같은 모든 콜리스틴 내성 균주를 확인할 수 있어, 콜리스틴 내성을 예측하는 데에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다. 특히 슈도모나스 에로지노사에 있어서, 본 발명의 배지 조성물을 이용하여 디스크 확산 실험을 한 결과, MIC와 100% 일치율을 보이고 있는 바, 매우 중대한 오류 또는 중대한 오류가 없는 것을 알 수 있다.

[112]

[113] [실시예 5]

[114] 뮐러-힌턴 액체 배지 (BD Diagnostic)에서 아가 입자(BD Diagnostic, Sparks,

MD, USA)의 농도를 17 g/L의 30%인 5.1 g/L로 조정하고, 구아니딘 하이드로클로라이드(Guanidine hydrochloride)를 500 μg/ml, 50 μg/ml 또는 5 μg/ml의 농도로 첨가한 뒤 이를 고형화시켰다. 이렇게 준비된 각 배지의 표면에 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 아시네토박터 바우만니(ABA) 균주, 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 클렙시엘라 뉴모니아(Klebsiella pnemoniae; KPN) 균주 및 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 슈도모나스 에로지노사(Pseudomonas aeruginosa; PAE) 균주를 고르게 접종하고 그 위에 콜리스틴 디스크를 놓은 뒤 디스크 주변에 투명하게 형성된 성장 억제 영역을 촬영하여 그 결과를 도 8 내지 10에 나타내었고, 상기 성장 억제 영역의 직경을 측정하여 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[115] [표3]

아가 농도	구아니딘 하이드로클로라이드 농도	디스크 확산(mm)											
		ABA				KPN				PAE			
		A17_S	A14_S	A5_R	A532_R	K3007_S	K3070_S	K4036_R	K4056_R	P1401_S	P1477_S	P1618_R	P1624_R
30%	500μg/ml	15	15	10	9	16	17	14	10	16	14	13	12
	50μg/ml	15	15	10	9	16	16	16	12	15	16	13	12
	5μg/ml	15	15	10	9	17	17	16	12	16	16	12	12

[116] 상기 표 3 및 도 8 내지 10에서 보는 바와 같이, 아가 농도를 일반적 뮐러-힌턴 배지의 아가 농도(17 g/L)의 30% 양인 5.1 g/L로 조정하고, 구아니딘 하이드로클로라이드를 5 내지 500 ㎍/ml의 양으로 첨가하자 콜리스틴 내성 균주에서는 성장 억제 영역의 크기에 변화가 없었지만, 콜리스틴 감수성 균주에서는 성장 억제 영역의 직경이 증가한 것을 확인할 수 있었고, 특히 5 내지 50 ㎍/ml의 양으로 첨가하였을 때 균주의 성장 또한 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

[117] 본 발명은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위하여 디스크 확산법(disk diffusion method)에 사용될 수 있는 배지 조성물과, 이를 이용하여 디스크 확산법에 의해 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

[118]

청구범위

[청구항 1] 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및
프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 ㎍/ml 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 ㎍/ml 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 배지 조성물은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지인, 배지 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)인, 배지 조성물.

[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 항생제는 콜리스틴(colistin)인, 배지 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 프로타민의 염은 프로타민 황산염(protamine sulfate)인, 배지 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 구아니딘 염은 구아니딘 하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride)인, 배지 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 배지 조성물은 육추출물(beef extract)을 1.5 내지 2.5 g/L의 양으로 더 포함하는, 배지 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 배지 조성물은 카제인 가수분해물(casein hydrolysate)을 15 내지 20 g/L의 양으로 더 포함하는, 배지 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 배지 조성물은 전분을 1 내지 2 g/L의 양으로 더 포함하는, 배지 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 배지 조성물은 25 ℃의 상온에서 pH가 7 내지 7.5인, 배지 조성물.

[청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 배지 조성물에 목적하는 균주를 도말하는 단계; 및
상기 균주가 도말된 배지 조성물 상에 항생제를 포함하는 시편을 위치시키는 단계를 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 시편은 종이 또는 셀룰로오스 재질의 디스크(disk) 형상인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 시편은 항생제를 포함하는 용액에 침지된 것인, 항생제 감수성을

평가하는 방법.

[청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 배지 조성물 상에 시편을 위치시킨 뒤 4 ℃에서 1분 내지 24시간 동안 항생제의 전-확산(pre-diffusion) 시키는 단계를 더 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

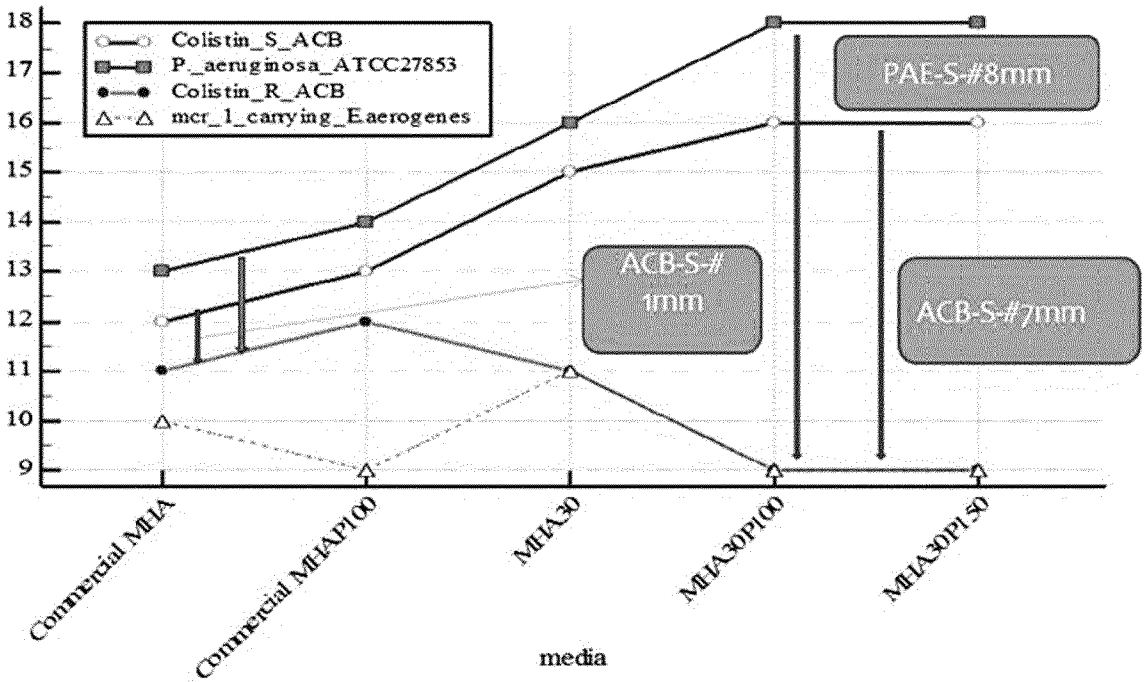
[청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 목적하는 균주를 도말하는 단계에 후속적으로 5 부피% CO_2, 37 ℃의 온도 하에서 10분 이상 균주를 배양하는 단계를 더 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

[청구항 16] 제11항에 있어서,
상기 배지 조성물 상에 시편을 위치시킨 뒤 상기 시편의 주변에 형성된 미생물 성장 억제 영역(inhibition zone)의 크기를 측정하여 항생제에 대한 목적하는 균주의 감수성을 측정하는 단계를 추가로 더 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

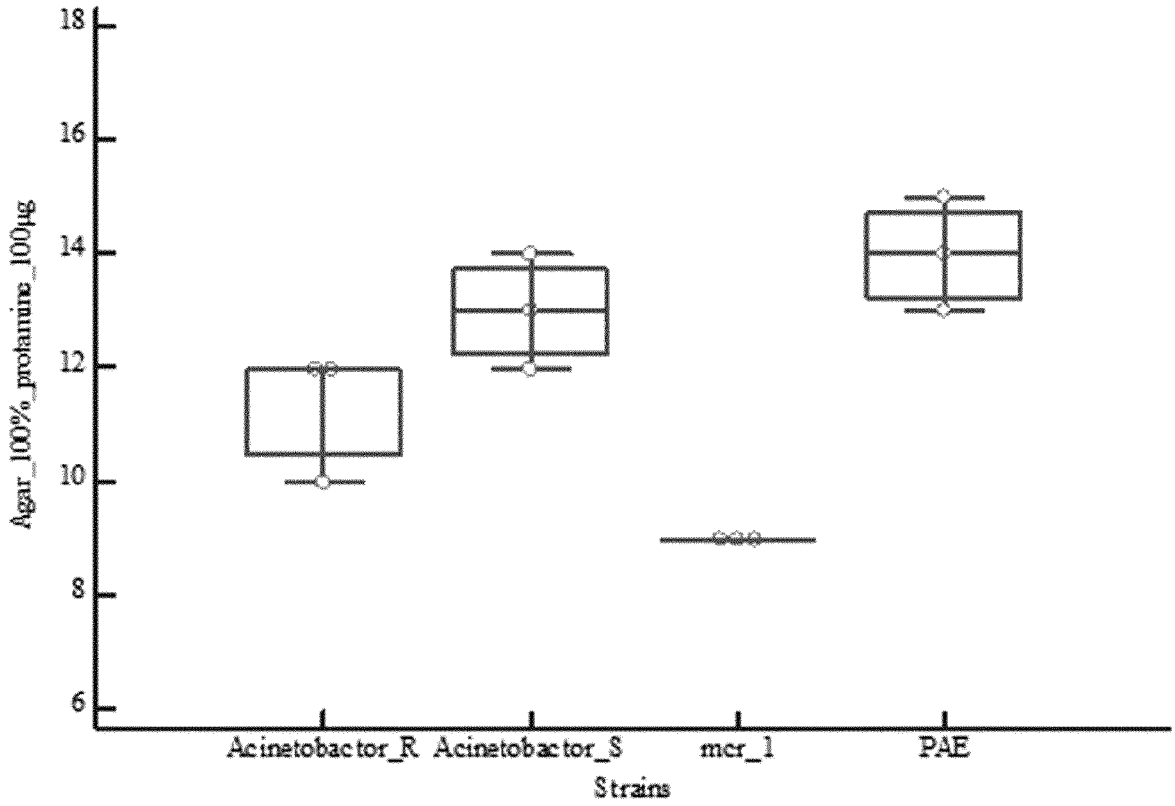
[청구항 17] 제11항에 있어서,
상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

[청구항 18] 제11항에 있어서,
상기 항생제는 콜리스틴(colistin)인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

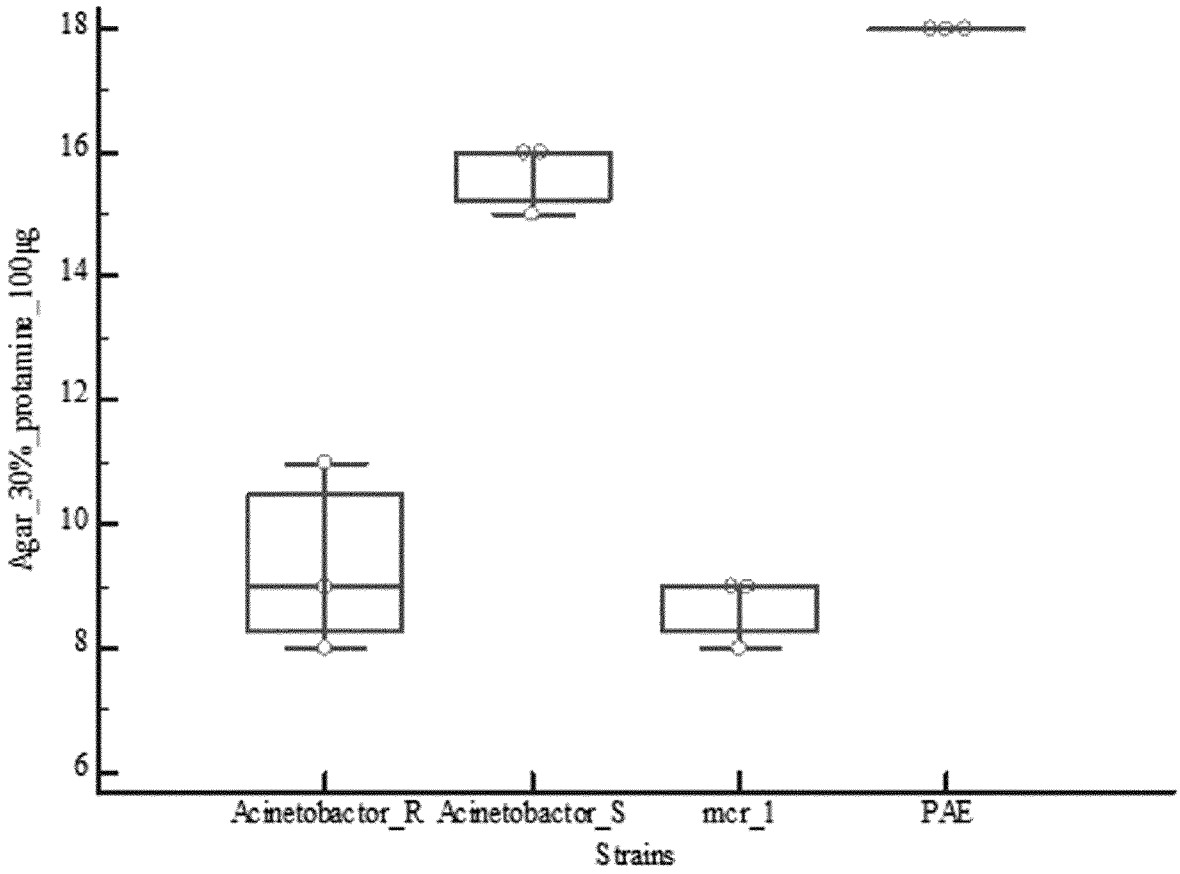
[도1]


Colistin_S_ACB
P._aeruginosa_ATCC27853
Colistin_R_ACB
mcr_1_carrying_E.aerogenes
PAE-S-#8mm
ACB-S-#1mm
ACB-S-#7mm
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
Commercial MHA
Commercial MHAP100
MHA30
MHA30P100
MHA30P150
media

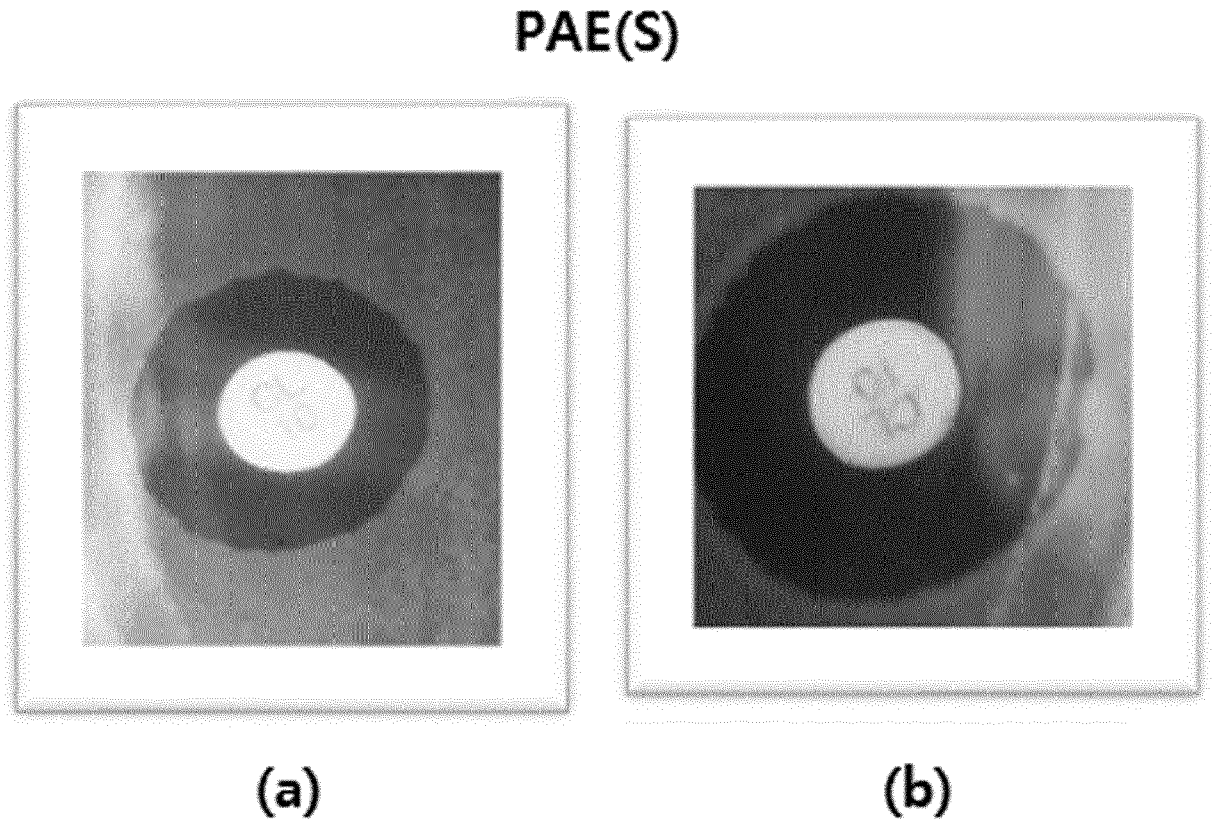
[도2a]


Agar_100%_protamine_100μg
18
16
14
12
10
8
6
Acinetobactor_R
Acinetobactor_S
mcr_1
PAE
Strains

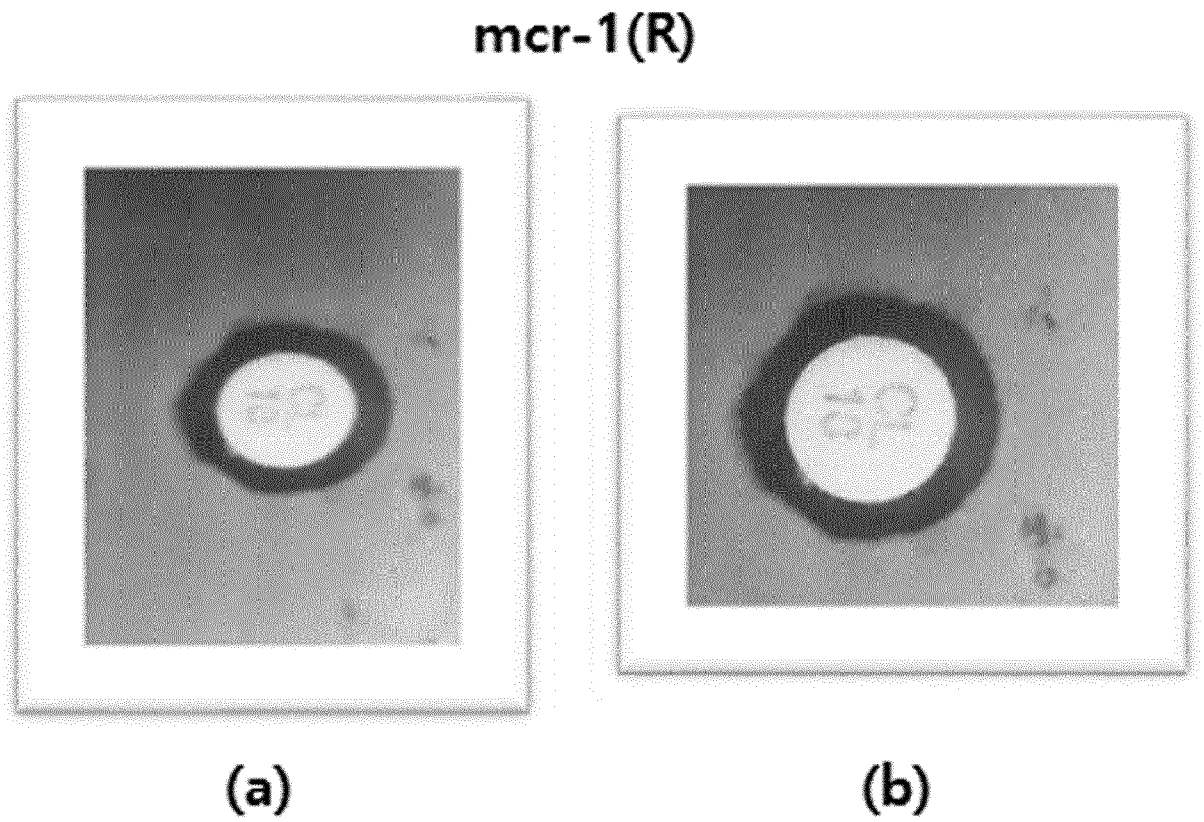
[도2b]


18
16
14
12
10
8
6
Agar_30%_protamine_100μg
Acinetobactor_R
Acinetobactor_S
mcr_1
PAE
Strains

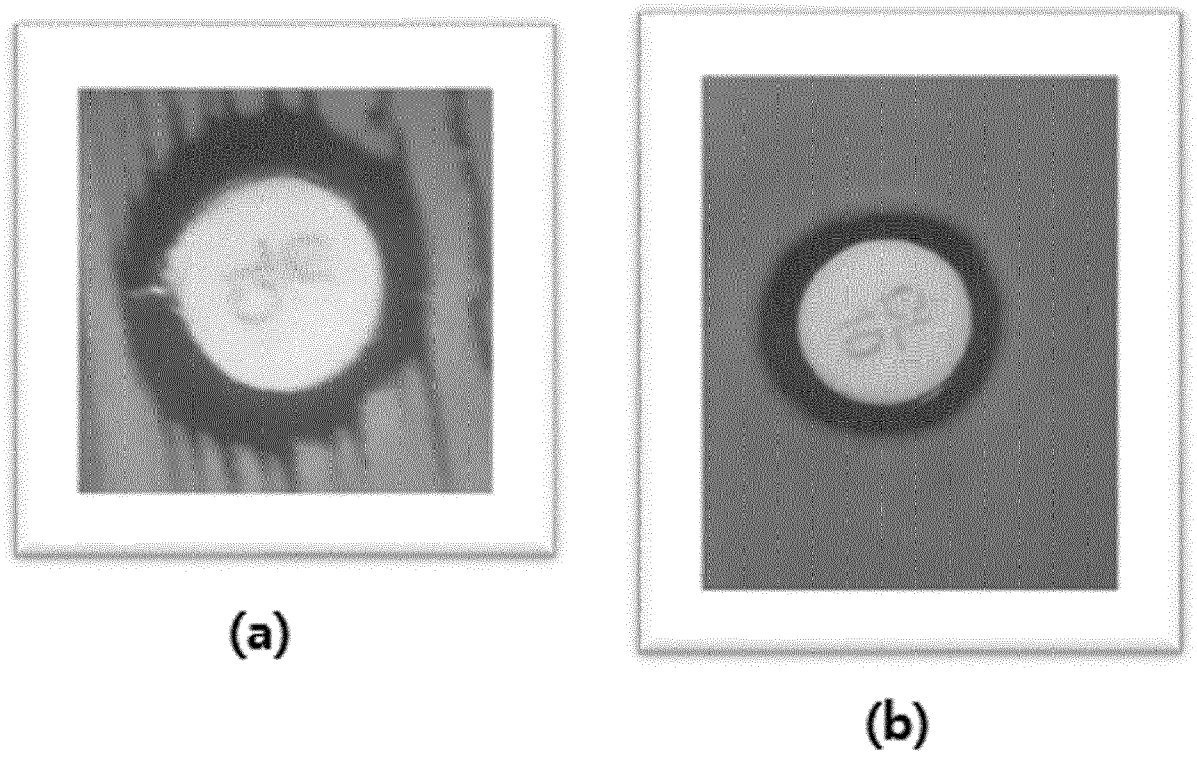
[도3]


PAE(S)
(a)
(b)

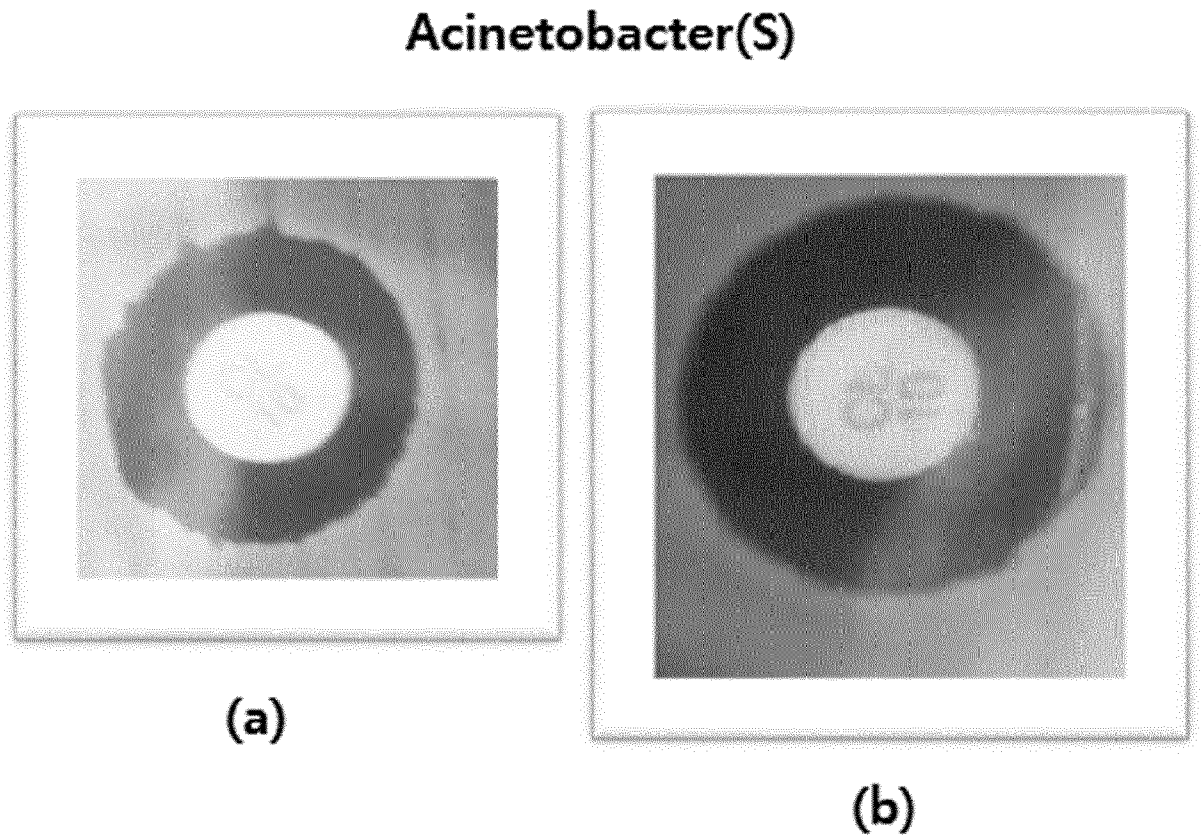
[도4]



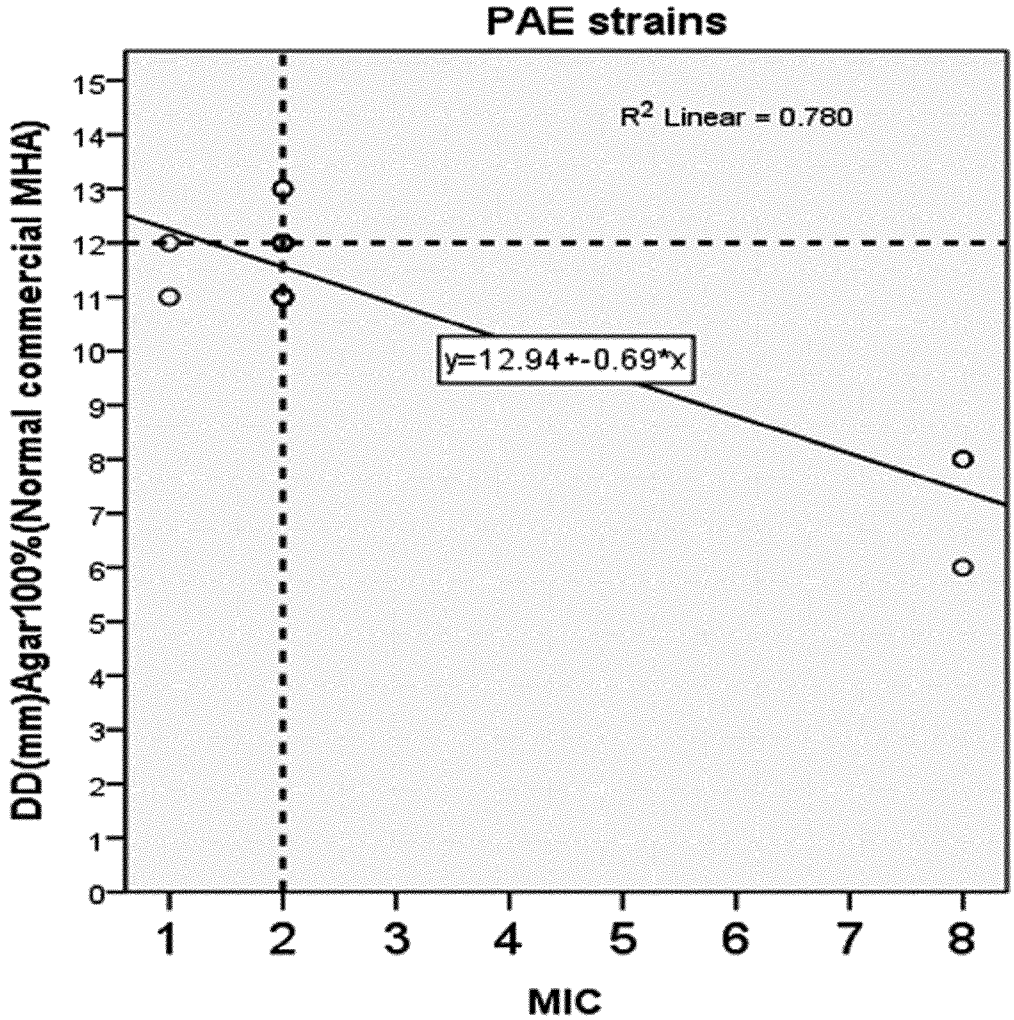
[도5]



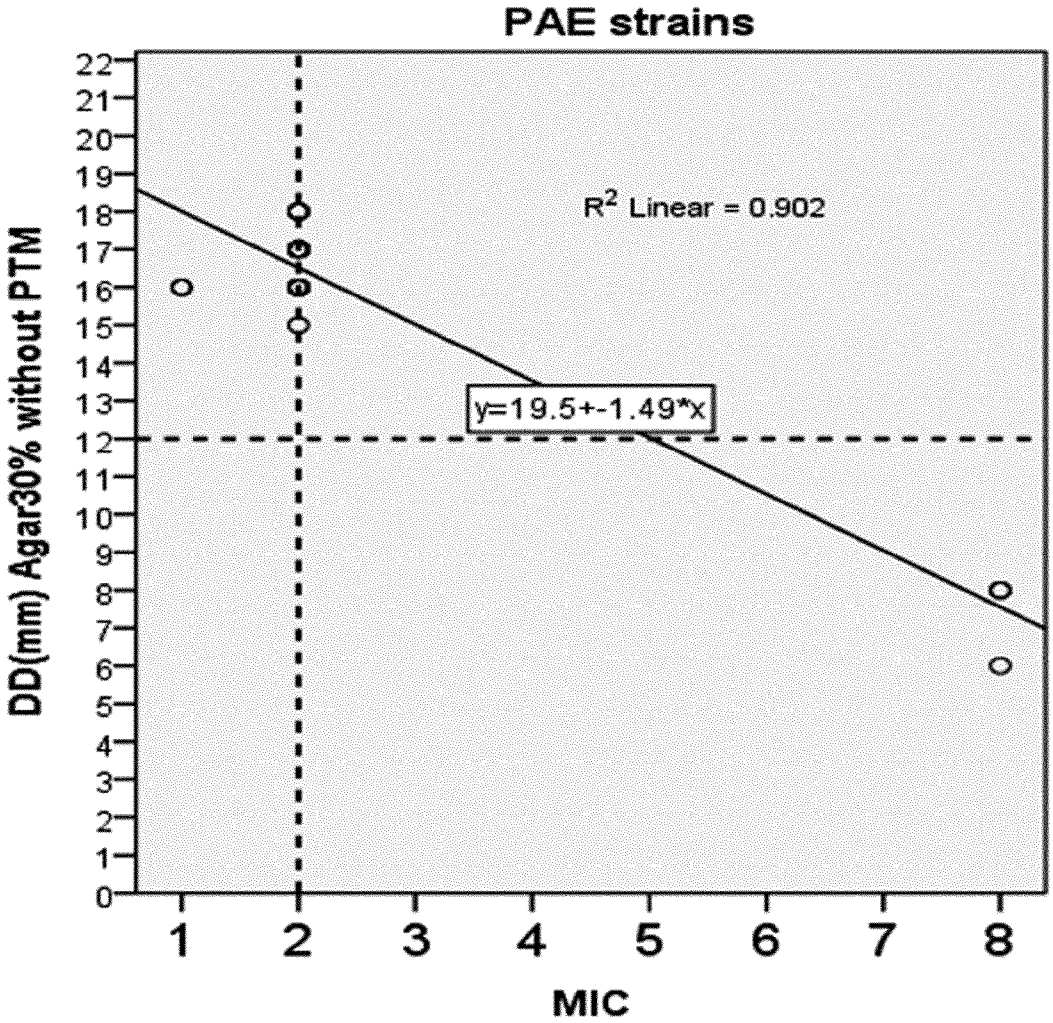
[도6]


Acinetobacter(S)
(a)
(b)

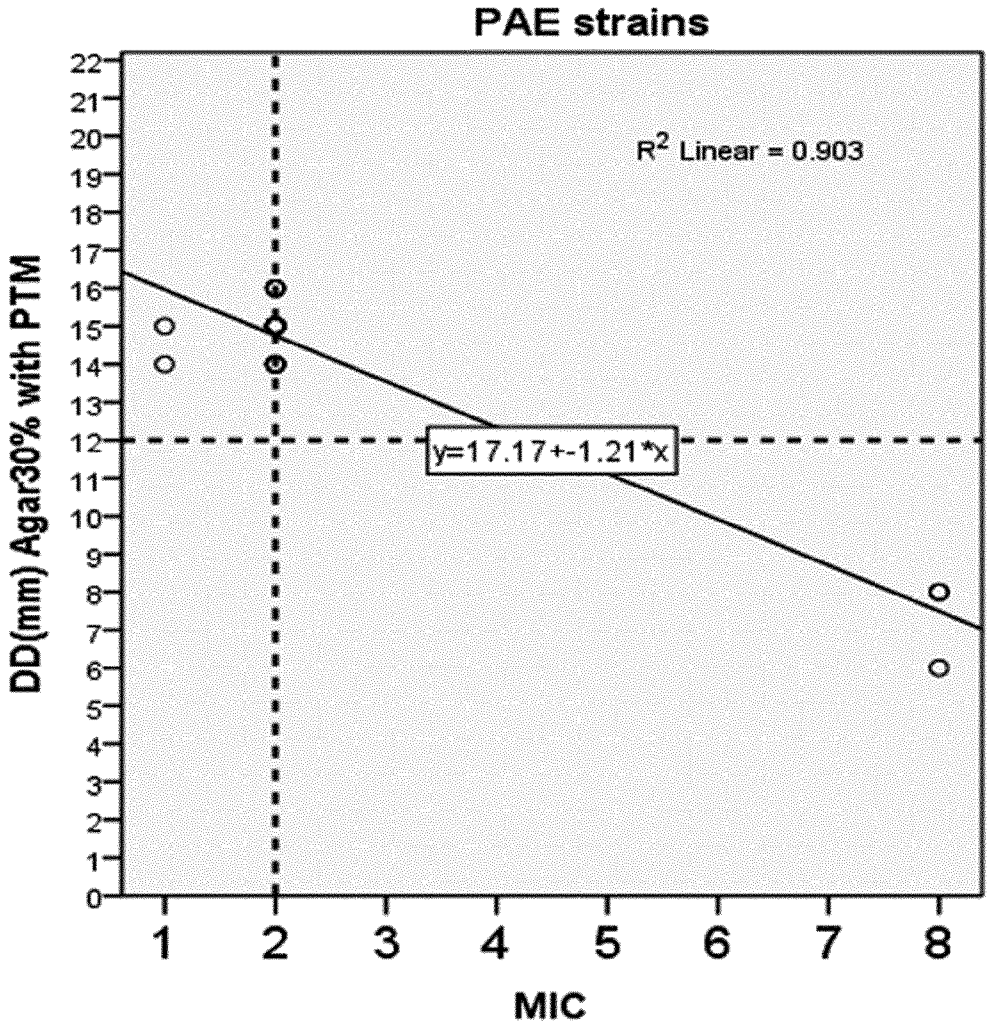
[도7a]


PAE strains
R2 Linear = 0.780
y=12.94+-0.69*x
DD(mm)Agar100%(Normal commercial MHA)
MIC
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

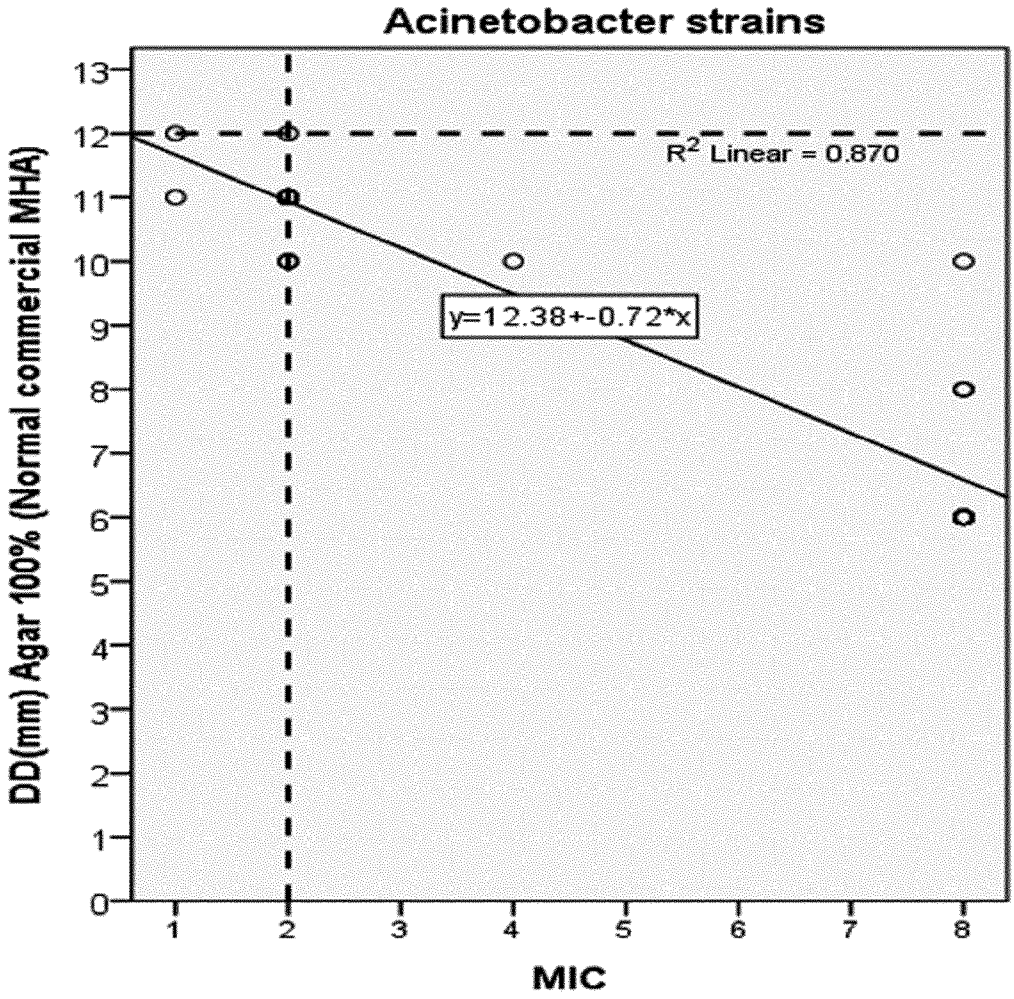
[도7b]


PAE strains
DD(mm) Agar30% without PTM
MIC
R2 Linear = 0.902
y=19.5+-1.49*x
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

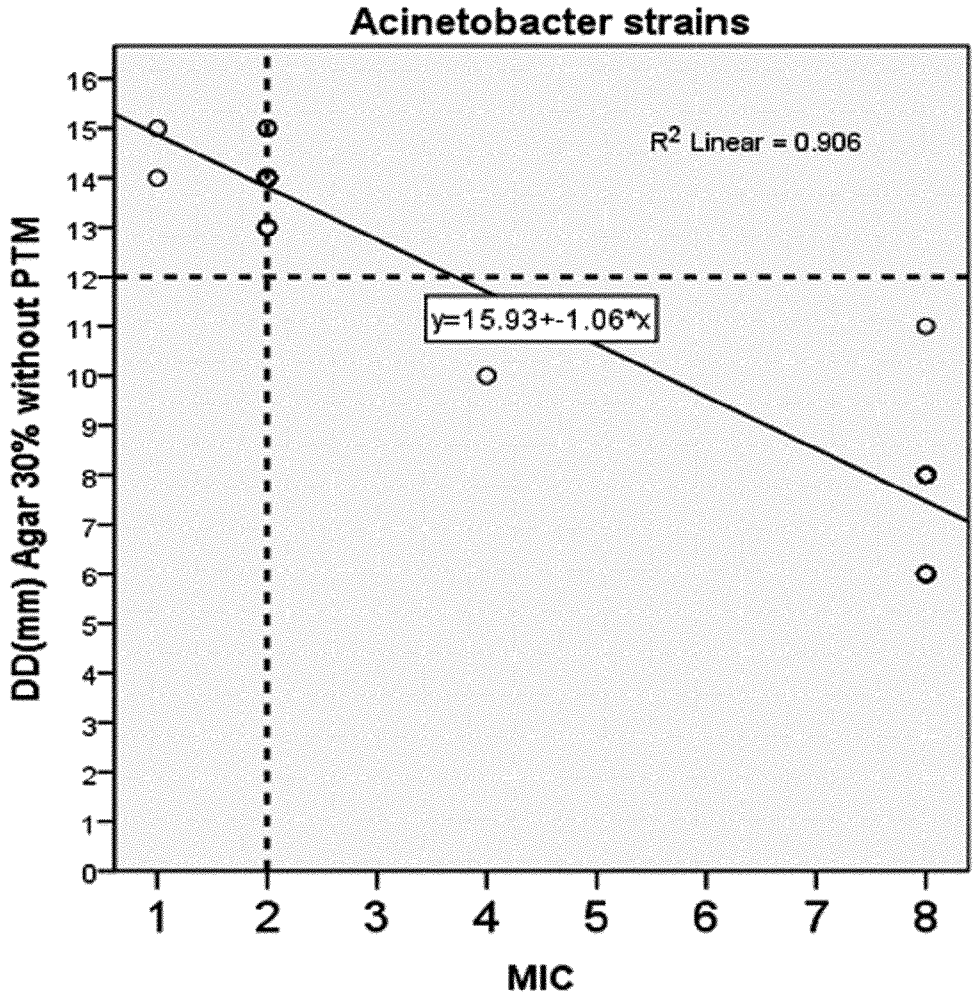
[도7c]


PAE strains
R^2 Linear = 0.903
y=17.17+-1.21*x
DD(mm) Agar30% with PTM
MIC
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

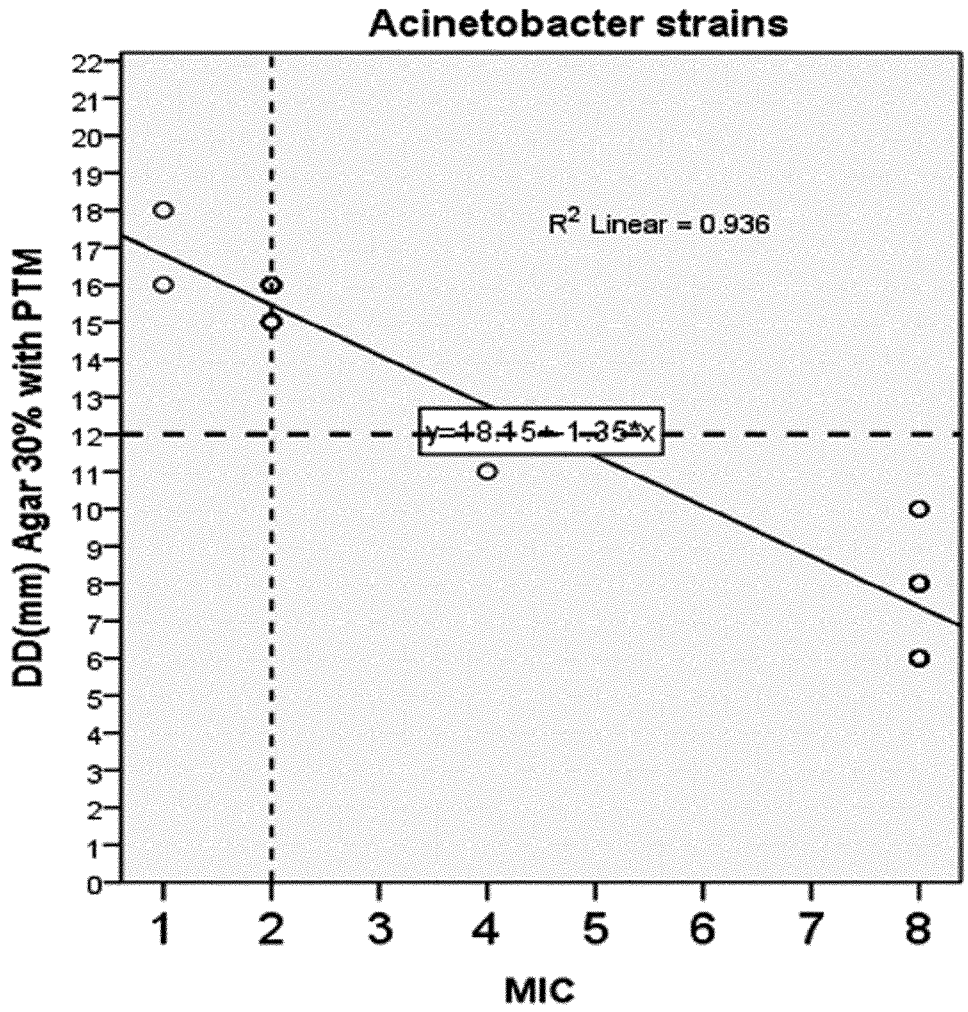
[도7d]


Acinetobacter strains
DD(mm) Agar 100% (Normal commercial MHA)
MIC
R2 Linear = 0.870
y=12.38+-0.72*x
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

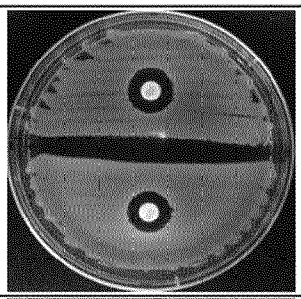
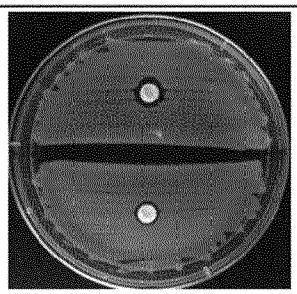
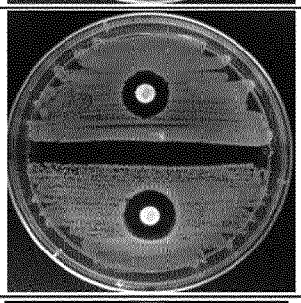
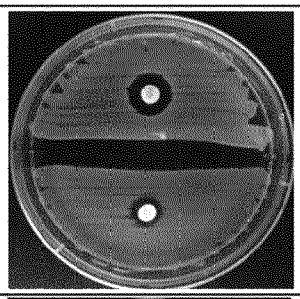
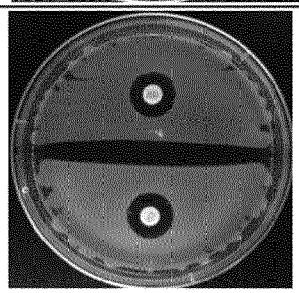
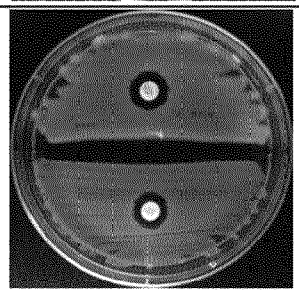
[도7e]


Acinetobacter strains
R2 Linear = 0.906
y=15.93+-1.06*x
DD(mm) Agar 30% without PTM
MIC
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
1
2
3
4
5
6
7
8

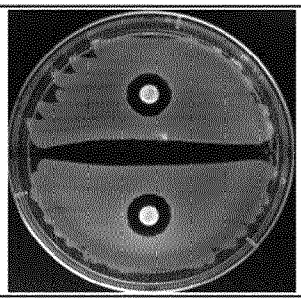
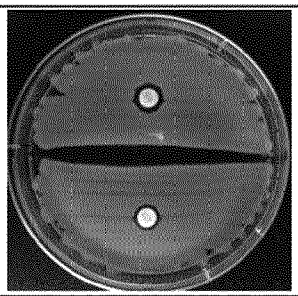
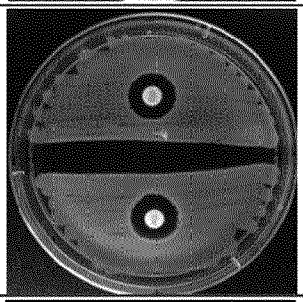
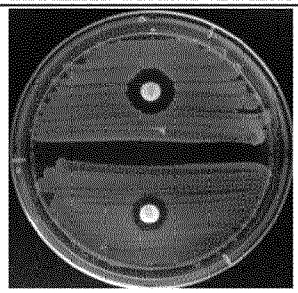
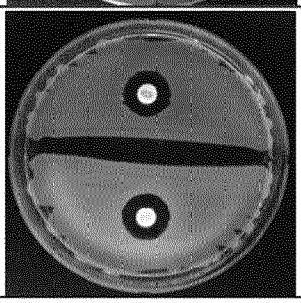
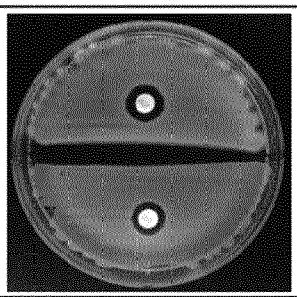
[도7f]


Acinetobacter strains
DD(mm) Agar 30% with PTM
MIC
R2 Linear = 0.936
y=18.45-1.35*x
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

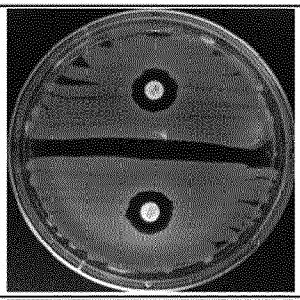
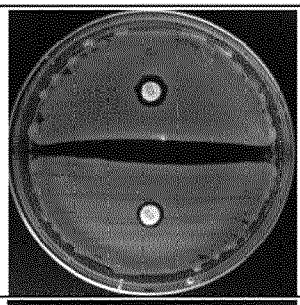
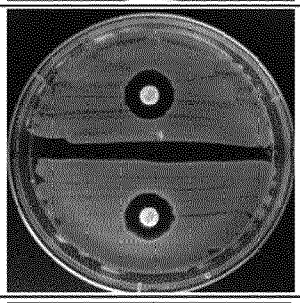
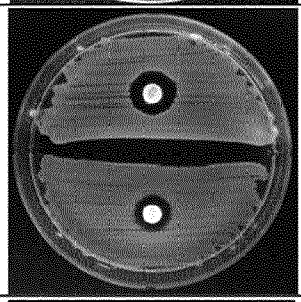
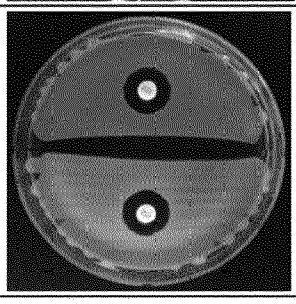
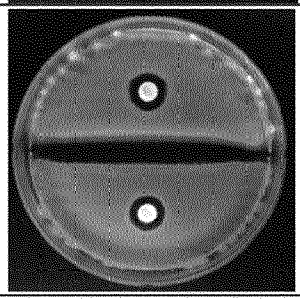
[도8]

구분	500ug/ml Guanidine hydrochloride in 30% Agar	
ABA	A17_S A14_S 	A5_R A532_R 
KPN	K3007_S K3070_S 	K4036_R K4056_R 
PAE	P1401_S P1477_S 	P1618_R P1624_R 

[도9]

구분	50ug/ml Guanidine hydrochloride in 30% Agar	
ABA	A17_S A14_S 	A5_R A532_R 
KPN	K3007_S K3070_S 	K4036_R K4056_R 
PAE	P1401_S P1477_S 	P1618_R P1624_R 

[도10]

구분	5ug/ml Guanidine hydrochloride in 30% Agar			
ABA	A17_S A14_S		A5_R A532_R	
KPN	K3007_S K3070_S		K4036_R K4056_R	
PAE	P1401_S P1477_S		P1618_R P1624_R	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/008241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/18(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/18; C12Q 1/04; G01N 33/53; G06F 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: antibiotic, susceptibility, disk diffusion, medium, agar, protamine, guanidine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1439918 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 15 September 2014 See abstract; paragraphs [0027], [0047]; claims 1-9.	1-18
A	ESCAMILLA-GARCIA, E. et al. Antimicrobial Activity of a Cationic Guanidine Compound against Two Pathogenic Oral Bacteria. International journal of microbiology. 04 May 2017, vol. 2017, article no. 5924717, pages 1-9 See abstract; page 3, left column.	1-18
A	WO 00-55357 A1 (AKZO NOBEL N.V. et al.) 21 September 2000 See the entire document.	1-18
A	WO 2013-016529 A2 (THE MEDICINES COMPANY) 31 January 2013 See the entire document.	1-18
A	KR 20-0325376 Y1 (SHIN, Sue et al.) 04 September 2003 See the entire document.	1-18
PX	VU, T. N. et al. P2794 Modified double-disk potentiation test to determine phage-antibiotic synergy in carbapenem-resistant Acinetobacter species. 29th ECCMID The congress pf ESCMID. 13-16 April 2019, Amsterdam, Netherlands See Conclusion	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 OCTOBER 2019 (18.10.2019)	**18 OCTOBER 2019 (18.10.2019)**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/008241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1439918 B1	15/09/2014	US 2015-0087012 A1	26/03/2015
WO 00-55357 A1	21/09/2000	AT 535613 T	15/12/2011
		AU 3872000 A	04/10/2000
		AU 5615300 A	19/02/2001
		AU 766292 B2	16/10/2003
		CA 2365232 A1	21/09/2000
		CA 2380027 A1	08/02/2001
		CA 2380027 C	05/04/2011
		EP 1163362 A1	19/12/2001
		EP 1163362 A4	29/12/2004
		EP 1163362 B1	31/07/2013
		EP 1198587 A1	24/04/2002
		EP 1198587 A4	07/06/2006
		EP 1198587 B1	30/11/2011
		JP 2002-538833 A	19/11/2002
		JP 2003-505106 A	12/02/2003
		JP 4842473 B2	21/12/2011
		JP 4860822 B2	25/01/2012
		US 2001-0039032 A1	08/11/2001
		US 6153400 A	28/11/2000
		US 6251624 B1	26/06/2001
		US 6416969 B2	09/07/2002
		WO 01-09371 A1	08/02/2001
WO 2013-016529 A2	31/01/2013	EP 2737077 A2	04/06/2014
		EP 2737077 A4	03/12/2014
		EP 2737077 B1	16/11/2016
		ES 2613806 T3	26/05/2017
		US 2013-0029371 A1	31/01/2013
		US 8815535 B2	26/08/2014
		WO 2013-016529 A3	04/04/2013
KR 20-0325376 Y1	04/09/2003	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/008241

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/18(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/18; C12Q 1/04; G01N 33/53; G06F 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항생제 (antibiotic), 감수성 (susceptibility), 디스크 확산 (disk diffusion), 배지 (medium), 아가 (agar), 프로타민 (protamine), 구아니딘 (guanidine)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1439918 B1 (연세대학교 산학협력단) 2014.09.15 요약; 단락 [0027], [0047]; 청구항 1-9 참조.	1-18
A	ESCAMILLA-GARCIA, E. 등, "Antimicrobial Activity of a Cationic Guanidine Compound against Two Pathogenic Oral Bacteria", International journal of microbiology, 2017.05.04, 2017권, 아티클번호 5924717, 페이지 1-9 초록; 페이지 3, 왼쪽 컬럼 참조.	1-18
A	WO 00-55357 A1 (AKZO NOBEL N.V. 등) 2000.09.21 전문 참조.	1-18
A	WO 2013-016529 A2 (THE MEDICINES COMPANY) 2013.01.31 전문 참조.	1-18
A	KR 20-0325376 Y1 (신수 등) 2003.09.04 전문 참조.	1-18
PX	VU, T. N. 등, "P2794 Modified double-disk potentiation test to determine phage-antibiotic synergy in carbapenem-resistant Acinetobacter species", 29th ECCMID The congress pf ESCMID. 2019.04.13-16, Amsterdam, Netherlands 결론 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 10월 18일 (18.10.2019)	2019년 10월 18일 (18.10.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/008241

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1439918 B1	2014/09/15	US 2015-0087012 A1	2015/03/26
WO 00-55357 A1	2000/09/21	AT 535613 T	2011/12/15
		AU 3872000 A	2000/10/04
		AU 5615300 A	2001/02/19
		AU 766292 B2	2003/10/16
		CA 2365232 A1	2000/09/21
		CA 2380027 A1	2001/02/08
		CA 2380027 C	2011/04/05
		EP 1163362 A1	2001/12/19
		EP 1163362 A4	2004/12/29
		EP 1163362 B1	2013/07/31
		EP 1198587 A1	2002/04/24
		EP 1198587 A4	2006/06/07
		EP 1198587 B1	2011/11/30
		JP 2002-538833 A	2002/11/19
		JP 2003-505106 A	2003/02/12
		JP 4842473 B2	2011/12/21
		JP 4860822 B2	2012/01/25
		US 2001-0039032 A1	2001/11/08
		US 6153400 A	2000/11/28
		US 6251624 B1	2001/06/26
		US 6416969 B2	2002/07/09
		WO 01-09371 A1	2001/02/08
WO 2013-016529 A2	2013/01/31	EP 2737077 A2	2014/06/04
		EP 2737077 A4	2014/12/03
		EP 2737077 B1	2016/11/16
		ES 2613806 T3	2017/05/26
		US 2013-0029371 A1	2013/01/31
		US 8815535 B2	2014/08/26
		WO 2013-016529 A3	2013/04/04
KR 20-0325376 Y1	2003/09/04	없음	