



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0036730
(43) 공개일자 2016년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/445 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0128299
(22) 출원일자 2014년09월25일
심사청구일자 2014년09월25일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
정진용
경기 성남시 분당구 중앙공원로 54, 225동 1402호
(서현동, 시범단지우성아파트)
김양수
서울특별시 성동구 독서당로 218, 104동 901호(옥수삼성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

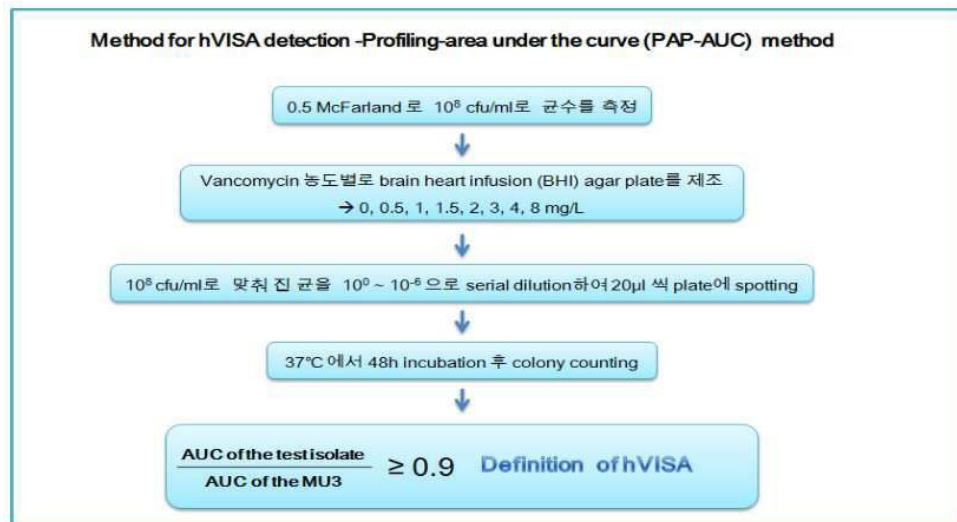
(54) 발명의 명칭 **안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 배양방법**

(57) 요약

본 발명은 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)를 확인하는 단계; 상기 확인된 최소억제농도(MIC)의 반코마이신이 포함된 배지에 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)이 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)으로 변환된 것을 확인하는 단계를 포함하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 배양방법을 제공한다.

본 발명에 따른 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 배양방법은 임상 환자에서만 얻을 수 있었던 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 in vitro 에서 빠르고 효율적으로 제공할 수 있으므로, 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)와 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 간의 유전자 차이 및 hVISA 감염 환자의 치료 방법 연구에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정용필

서울특별시 강동구 풍성로 114-1, 101동 1507호(성내동, 성안마을 청구아파트)

박수진

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 101동 206호(목동, 한신청구아파트)

김희승

서울특별시 광진구 구의로4길 12-4 (구의동)

김소영

서울특별시 강동구 양재대로 1656, 206동 803호 (명일동, 삼익그린맨션)

김은실

서울특별시 서초구 청계산로 7길 43, 501동 706호 (신원동, 서초포레스타5단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0872(A120964)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균의 특성

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

반코마이신 감수성 황색포도알균(*vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus*; VSSA)의 최소억제농도(MIC)를 확인하는 단계;

상기 확인된 최소억제농도(MIC)의 반코마이신이 포함된 배지에 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)을 배양하는 단계; 및

상기 배양된 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)이 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(*heteroresistant vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*; hVISA)으로 변화된 것을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)는 1 내지 4 mg/L인 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)은 반코마이신이 포함된 배지에서 16 내지 20시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법은 제 1항의 배양방법을 두 번 반복하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 반코마이신 감수성 황색포도알균을 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균으로 배양하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 메티실린 내성 황색포도알균(MRSA)균주 중에는, 반코마이신 최소억제농도가(MIC)가 2mg/L 이하인 반코마이신 감수성 황색포도알균(*vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus*; VSSA)과 반코마이신 최소억제농도(MIC)가 2mg/L이하로 나타나지만 subpopulation중 2mg/L이상인 군집이 포함되어 있는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(*heteroresistant vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*; hVISA)이 있다.

[0003] VSSA균으로 진단받은 환자가 항생제를 투여받으면서 hVISA가 되는 경우가 있고, 이것이 치료에 혼란을 초래할 수 있기 때문에 VSSA균과 hVISA균 사이에 유전학적 차이에 대한 연구가 필요하다. 하지만, 환자로부터 얻어진 VSSA 균이 환자가 반코마이신을 투약하므로써 hVISA로 변화되는 경우가 연구에 필요한 만큼 충분히 많은 균주쌍을 수집하는 데는 한계가 있다. 따라서, 동질유전자 균주(Isogenic paired strain)간의 유전자 발현 차이 및 유전자 변이를 연구하기 위하여 실험실에서 인위적으로 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균을 구축하

는 방법이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2013-0002503호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 앞서 기술한 바와 같이, 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)의 유전자 연구 및 치료제 개발을 위하여 in vitro에서 인위적으로 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 배양하는 방법이 요구됨에 따라, 반코마이신 감수성 황색포도알균을 모균주로 하여 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균으로 배양하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)를 확인하는 단계; 상기 확인된 최소억제농도(MIC)의 반코마이신이 포함된 배지에 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)이 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)으로 변환된 것을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명에 따른 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 배양방법은 임상 환자에서만 얻을 수 있었던 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 in vitro 에서 빠르고 효율적으로 제공할 수 있으므로, 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 간의 유전자 차이 및 hVISA 감염 환자의 치료 방법 연구에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 확인할 수 있는 군집 분석 프로파일링(population analysis profiling-area under the curve ; PAP-AUC) 단계를 나타내는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)를 확인하는 단계; 상기 확인된 최소억제농도(MIC)의 반코마이신이 포함된 배지에 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)을 배양하는 단계; 및 상기 배양된 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)이 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)으로 변환된 것을 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 구축하기 위한 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법을 제공한다.

[0010] 상세하게는, 상기 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)는 1 내지 4 mg/L인 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)의 최소억제농도(MIC)는 2 mg/L일 수 있다.

[0011] 또한, 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)은 반코마이신이 포함된 배지에서 16 내지 20시간 동안 배양될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0012] 본 발명의 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)을 확인하는 방법은 이테스트(E-test) 및 군집 분석 프로파일링(population analysis profiling ; PAP)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0013] 또한, 본 발명의 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA) 배양방법은 청구항 1의 배양방법을 두 번 반복하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0015] <실시예 1> 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 구축

[0016] 환자의 샘플에서 반코마이신 최소억제농도(MIC)가 $\leq 2\text{mg/L}$ 인 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)을 분리하고, 분리된 VSSA의 정확한 MIC를 확인한 후, 이와 동일한 농도의 반코마이신이 포함된 TSB(Tryptic soy broth)배지에 16 내지 20시간 배양하였다.

[0017] 그 후 이테스트(E-test)를 수행하여 배양된 황색포도알균의 MIC를 확인하고, 도 1과 같은 과정으로 군집 분석 프로파일링(population analysis profiling-area under the curve ; PAP-AUC)을 수행하여 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)으로 변화하였는지 판별하였다. 판별을 통하여 hVISA로 나타나지 않은 균주는 상기 방법을 두 번 반복하여 총 세 번의 반코마이신 노출 후 이테스트(E-test)를 수행하여 hVISA로 변화하였는지 확인하였다.

[0018] VSSA는 이테스트(E-test)검사서 반코마이신 최소억제농도(MIC)가 $\leq 2\text{ mg/L}$ 이며, 군집 분석 프로파일링(population analysis profiling ; PAP)에서 AUC(area under the curve) ratio 가 0.9 미만일 경우이며, hVISA는 이테스트(E-test)검사서 MIC가 $\leq 2\text{ mg/L}$ 인 것과 $2\geq\text{mg/L}$ 인 것이 섞여있고 PAP에서 AUC(area under the curve) ratio 가 0.9 에서 1.3 사이일 때를 의미한다.

[0019] PAP-AUC는 반코마이신 농도에 따른 군수 감소 정도를 그래프로 그려 균의 면적과 표준균(Mu3)의 면적과의 비율을 나타내는 hVISA 확진 검사이다.

[0020] 그 결과, 표 1과 같이 반코마이신에 노출시킨 6개의 반코마이신 감수성 황색포도알균(VSSA)이 hVISA로 변화한 것을 확인하였다.

표 1

균주	최초		1 st 또는 3 rd 반코마이신 노출(exposure)	
	MIC	AUC ratio	MIC	AUC ratio
strain 1	2	0.7	2	1.1
strain 2	2	0.7	2	1.2
strain 3	2	0.7	3	1.2
strain 4	2	0.6	3	1.1
strain 5	2	0.5	2	1.0
strain 6	2	0.6	3	1.1

[0022] 상기 표 1과 같이 hVISA로 확인된 균주를 반코마이신이 포함되지 않은 TSB(Tryptic soy broth)배지에 16 내지 20시간 배양하였는데, 하룻밤 배양하고 그 다음날마다 신선한 TSB 배지에 계대 배양하는 방법으로 총 세 번 계대 배양하였다.

[0023] 그 후 이테스트(E-test)를 수행하여 배양된 황색포도알균의 MIC를 확인하고,도 1과 같은 과정으로 군집 분석 프로파일링(population analysis profiling-area under the curve ; PAP-AUC)을 수행하여 hVISA가 유지되고 있는지 확인하였다.

[0024] 만약 확인결과, 반코마이신이 VSSA 균주의 최초 MIC 농도로 포함된 TSB 배지에서 삼일 동안 배양하여도 hVISA가 확인되지 않을 경우에는 MIC의 농도를 두 배 높여 상기 과정을 다시 반복하였다.

[0025] 그 결과, 표 2와 같이 반코마이신이 포함되지 않은 TSB 배지에서도 hVISA가 유지되고 있음을 확인하였다. 또한, 반코마이신이 포함되지 않은 TSB 배지에서 hVISA를 여섯 번째까지 계대 배양하여도 AUC ratio 값이 크게 변화하지 않은 것이 확인됨에 따라, 여러 번의 계대 배양에도 hVISA가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

표 2

균주	stable hVISA(3 rd)		stable hVISA(6 th)	
	MIC	AUC ratio	MIC	AUC ratio
strain 1	2	0.9	2	1.0
strain 2	2	1.1	2	1.1
strain 3	4	1.3	2	1.0
strain 4	2	1.0	1.5	1.0
strain 5	2	0.9	2	1.0
strain 6	4	1.1	2	1.2

상기 결과로부터 본 발명에 따른 hVISA 구축방법은 안정화된 hVISA를 구축하고 유지하는데 매우 유용한 방법임이 확인되었다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

도면

도면1

