



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0120910
(43) 공개일자 2013년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

C12R 1/445 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0044146

(22) 출원일자 2012년04월26일

심사청구일자 2012년04월26일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

김양수

서울특별시 성동구 옥수동 삼성아파트 104동 901호

정진용

경기도 성남시 분당구 서현동 시범단지한양아파트 326동 1406호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

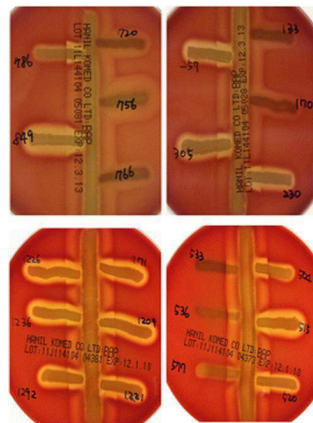
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **agr 기능 장애를 이용한 메티실린 내성 황색포도알균 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단 방법**

(57) 요약

본 발명은 agr 기능 장애를 이용한 메티실린 내성 황색포도알균 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법에 관한 것으로서, 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주를 배양하는 단계; 상기 배양 균주의 텔타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 텔타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 통해 agr 기능 장애(aggr dysfunction) 여부를 평가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법을 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정용필

서울특별시 강동구 성내1동 295 성안마을청구아파트 101동 1507호

박기호

서울특별시 양천구 신정1동 신시가지10단지아파트 1014동 801호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029936

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 예방 백신, 진단법, 치료법, 예후 판정법 개발을 위한 MRSA와 수퍼박테리아의 타겟 발굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029937

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 MRSA와 수퍼박테리아의 임상 연구, 균주와 인체자원 확보 및 분자세균학적 연구를 통한 타

겟 발굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029938

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 Transcriptome 및 proteome 기술을 이용하여 수퍼박테리아 제어를 위한 세균학적 타겟 발

굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주를 배양하는 단계;

상기 배양 균주의 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 통해 agr 기능 장애(agr dysfunction) 여부를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주는 *Staphylococcus aureus* RN4220 균주인 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주를 배양하는 단계는 sheep blood가 첨가된 고체배지에 상기 균주를 streaking 하여 배양하는 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성 측정은 sheep blood가 첨가된 고체배지의 용혈 부분(zone) 크기에 따라 용혈작용 유무를 판별하는 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 agr 기능 장애(accessory gene regulator dysfunction)를 이용한 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신(vancomycin) 비감수성의 동시 진단방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 1940년도에 페니실린이 처음 임상에 도입된 당시에는 대부분의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 페니실린 감수성이 있었으나, 1941년도부터 출현한 페니실린 내성은 급속히 증가하여 1950년대에는 이미 60% 이상의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)이 페니실린 내성을 보유하였다. 이를 치료하기 위하여 개발된 메티실린(methicillin)이 1960년도에 도입되었으나 1961년도부터 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA)이 출현하기 시작했다.

[0003] MRSA는 전 세계 각지의 병원에서 가장 중요한 병원감염균으로 자리잡고 있다. 특히 한국, 일본, 대만, 홍콩, 싱가포르, 스리랑카 및 일부 미국 병원에서는 병원에서 분리되는 황색포도알균의 50% 이상이 MRSA인 것으로 보고되고 있다[Lancet 2006;368:874-85]. 국내 병원의 MRSA 발생율은 1996년에 국내 15개 병원에서 전향적으로 시행한 연구의 결과 83.7%인 것으로 나타났다[Am J Infect Control 2000;28:454-8]. 1997년부터 2006년까지 다기관 연구를 통하여 보고된 MRSA의 빈도는 64-72%로서 국내 병원에서 가장 흔한 병원 감염의 원인균으로 확인되었다[Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1124-7; Yonsei Med J 2000;41:497-506; Korean J Clin Microbiol 2007;10:59-69]. 한편, 1970-80년대에 범세계적으로 MRSA에 의한 병원 감염이 확산되어 반코마이신(vancomycin)이 임상에서 광범위하게 사용되었다[Infect Chemother 2011;43(6):443-449].

[0004] Agr(accessory gene regulator)은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 가장 중요한 글로벌 조절 유전자들

(global regulator genes)이다. 황색포도알균의 밀도 조절(quorum-sensing), 병원 조절 뿐만 아니라 특히 MRSA의 치료 항생제인 반코마이신(vancomycin)의 감수성 저하에 관여한다[J. Infect. Dis. 2004;190:1140-1149; Antimicrob. Agents Chemother. 2007; 51:1089-1091]. 따라서 MRSA가 agr 기능 장애(agr dysfunction)을 보이는 경우 반코마이신(vancomycin)에 대한 감수성이 저하되어, 반코마이신(vancomycin)을 환자에게 투여한 경우 치료에 대한 반응이 좋지 않을 수 있음이 예측가능하다.

[0005] 환자의 검체에서 황색포도알균이 배양되었을 때 이것이 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA)인지 메티실린 감수성 황색포도알균(methicillin-susceptible *S. aureus*; MSSA)인지에 대한 감별이 중요하다. 이는 자동화기계에 의한 생화학적 검사를 통해서 감별 진단할 수 있는데, 검사 결과를 얻기 위해서는 추가적으로 하루 이상의 시간이 필요하다. 또한 MRSA와 MSSA를 빨리 감별하기 위한 방법들이 개발되어 있지만, 가격 등 여러 가지 제한점이 있어서 사용이 어려운 실정이다. 한편, 반코마이신(vancomycin)에 대한 감수성 검사는 생화학적 검사와 동시에 자동화기계에 의하여 이루어지는데, 아직 정확도가 떨어지기 때문에 그 결과를 이용할 수가 없다.

[0006] 따라서 본 발명자들은 agr 기능 장애(agr dysfunction)를 이용하여 배양검사에서 MRSA임을 진단하고, 동시에 반코마이신(vancomycin)에 대한 감수성이 저하되는 것을 진단할 수 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 통해 agr 기능 장애(agr dysfunction) 여부를 평가하여 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주를 배양하는 단계; 상기 배양 균주의 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 통해 agr 기능 장애(agr dysfunction) 여부를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) 및 반코마이신 비감수성의 동시 진단방법을 제공한다.

[0009] 상세하게는 상기 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주는 *Staphylococcus aureus* RN4220 균주인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 균주를 배양하는 단계는 sheep blood가 첨가된 고체배지에 상기 균주를 streaking 하여 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 보다 상세하게는 상기 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성 측정은 sheep blood가 첨가된 고체배지의 용혈 부분(zone) 크기에 따라 용혈작용 유무를 판별하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 agr 기능 장애(agr dysfunction)를 이용하면 기존의 자동화기계에 의한 생화학적 검사에 따른 MRSA 감별과 별도 E-test 실시에 따른 반코마이신 감수성 측정에 비해 비용과 시간을 줄일 수 있다. 또한 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성 측정에 의한 배양검사를 통하여 MRSA를 진단하고 동시에 반코마이신 감수성이 저하되는 것을 진단할 수 있어 병원에서 일상적으로 빠르고 편리하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 agr(accessory gene regulator)의 자가활성화(autoactivation)를 나타낸다. AgrD 펩타이드는 SpsB와 AgrB에 의하여 처리되어 테일 티오락톤 링(tailed thiolactone ring; AIP) 형태로 방출된다. 이는 AgrC의 막투과 수용체 도메인(transmembrane receptor domain)으로 작용한다. 인산(phosphate)은 AgrA로 전달되고, 이는 두 개의 agr 프로모터로부터 전사를 활성화한다. P2 프로모터는 자가활성화 서킷(circuit)을 작동시키고, P3 프로모터는 시스템의 조절자인 RNAIII의 전사를 작동시킨다.

도 2는 황색포도알균 RN4220(*Staphylococcus aureus* RN4220) 균주를 이용하여 MRSA 균주들의 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 측정된 결과이다. 1) No d-hemolysis zone[용혈이 없는 경우로서 agr 기능 장애(agr dysfunction)로 진단]: 720, 756, 766, 133, 170, 533, 536, 577; δ -hemolysis zone + α -hemolysis zone[매

우 항진된 용혈 작용이 있는 경우]: 515, 849; δ -hemolysis zone[확연한 용혈 작용이 있는 경우]: 786, 257, 305, 230, 504, 520, 1171, 1209, 1221, 1226, 1236, 1292

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1 > 연구 대상 균주의 선정

[0015] 본 발명자는 황색포도알균 균혈증이 있었던 환자의 혈액배양에서 분리된 황색포도알균을 이용하였고, MRSA로 확인된 407개의 균주와 MSSA로 확인된 232개의 균주에 대해 agr 기능 장애(agr dysfunction) 여부를 분석하였다.

< 실시예 2 > 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성 측정을 통한 agr 기능 장애(agr dysfunction) 확인

[0017] 도 1에 나타난 바와 같이, P3 프로모터의 RNAIII로부터 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)이 발현된다. 베타-헤모라이신(β -hemolysin)만 만들어 내는 *S. aureus* RN4220 균주와 cross-streaking을 함으로써 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)의 활성을 결정한다. 이 베타-헤모라이신(β -hemolysin)은 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)에 의해서는 lysis가 증가되며, 알파-헤모라이신(α -hemolysin)에 의해서는 lysis가 저해된다. 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)이 존재하면 agr 기능(agr function)이 있는 것으로 진단하고, 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)이 없으면 agr 기능 장애(agr dysfunction)가 있는 것으로 진단한다.

[0018] RN4220 균주는 다량의 베타-헤모라이신을 생산하는 균주로서 델타-헤모라이신이 같이 존재하면 강력한 적혈구 용혈 작용을 한다. RN4220 균주를 5% sheep blood가 첨가된 tryptic soy agar plate의 중앙에 streaking 하고 이 주변에 델타-헤모라이신 활성을 측정하고자 하는 황색포도알균을 수직으로 streaking 하고 37도에 overnight 배양하여 sheep 적혈구의 용혈(hemolysis) 여부로 델타-헤모라이신 활성 여부를 판단하고, 델타-헤모라이신 활성이 없는 경우를 agr 기능 장애(agr dysfunction)로 판독한다.

[0019] 위와 같이 배양한 sheep blood agar plate에서 RN4220 균주 주위에 streaking한 특정 황색포도알균 균주의 델타-헤모라이신 발현 양상에 따라 용혈 zone의 크기가 달라지는데, 용혈 작용이 없음, 용혈 작용이 미약함, 확인한 용혈 작용이 있음, 용혈 작용이 뚜렷히 증가되어 있음, 용혈 작용이 매우 항진되어 있음으로 분류할 수 있고, 이중 용혈 작용이 없음과 용혈 작용이 미약한 경우는 해당 균주가 델타-헤모라이신 발현하지 않는 것으로 볼 수 있고, 이것으로 agr 기능 장애(agr dysfunction)이 있다고 판단할 수 있다.

표 1

MRSA 균주 및 MSSA 균주의 델타-헤모라이신(δ -hemolysin)의 활성

δ -hemolysin production	MRSA (<i>n</i> = 407)	MSSA (<i>n</i> = 232)
δ -hemolysis zone (agr function)	120 (29%)	204 (88%)
no δ -hemolysis zone (agr dysfunction)	287 (71%)	28 (12%)

[0021] 407 균주의 MRSA 균주 중에서 287 균주(71%)가 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 나타내어 agr 기능 장애

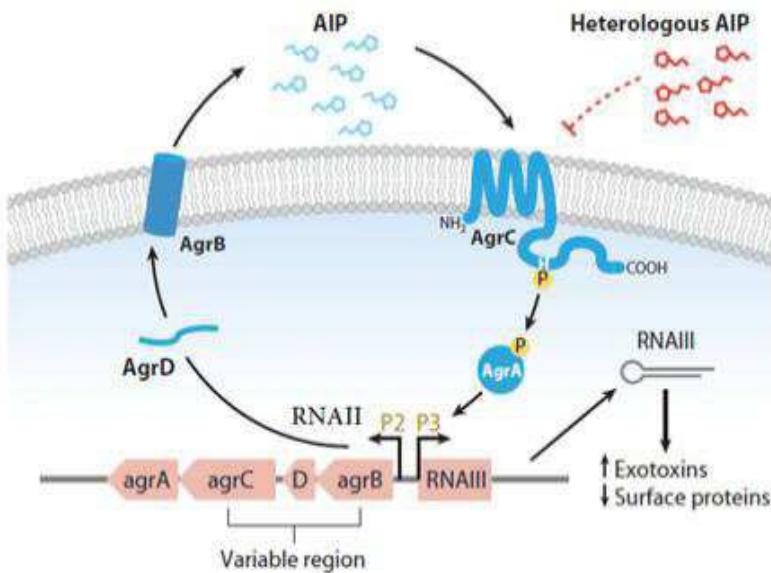
(agr dysfunction)가 있음이 관찰되었다. 한편 232 균주의 MSSA 균주 중에서는 28 균주(12%)만이 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성을 나타냈다.

[0022] 또한 agr 기능 장애(agr dysfunction)가 있는 경우 MRSA 균주일 positive predictive value는 92% $[287/(287 + 28) \times 100\%]$, negative predictive value는 63% $[204/(204 + 120) \times 100\%]$ 로 우수한 값을 나타내었다. MRSA 일 때 agr dysfunction일 민감도(sensitivity)는 71% $[287/(287 + 120) \times 100\%]$, 특이도(specificity)는 88% $[204/(204 + 28) \times 100\%]$ 로 역시 우수한 값을 보였다.

[0023] MRSA가 agr 기능 장애(agr dysfunction)를 보이는 경우 반코마이신(vancomycin)에 대한 감수성이 저하되므로, 상기의 실험 결과, 델타-헤모라이신(δ -hemolysin) 활성 측정에 의한 배양검사를 통하여 MRSA를 진단하고 동시에 반코마이신 감수성이 저하되는 것을 진단할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

