(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0066727
(43) 공개일자 2022년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6841 (2018.01) *C12Q 1/6837* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 1/6837 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0153079
(22) 출원일자 2020년11월16일
심사청구일자 2020년11월16일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
권태준
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김하진
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

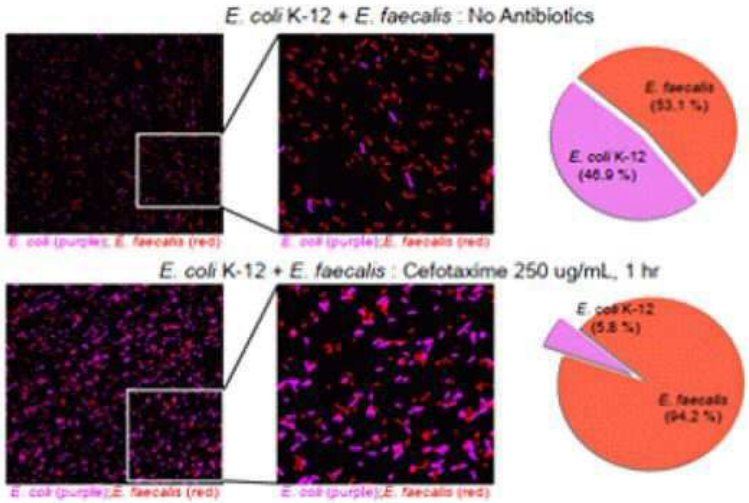
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **이미지 분석을 통한 항생제 감수성을 평가하는 방법**

(57) 요 약

본 출원은 이미지 분석을 통한 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따른 항생제 감수성을 평가하는 방법에 따르면, 시료 내 시험 미생물의 수준, 구체적으로, 시험 미생물의 양을 프로브 기반 분석법을 통해 정량화하여 분석함으로써, 수 시간 안에 시료 내 항생제 감수성을 평가할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2525/107 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2565/601 (2013.01)
(72) 발명자
강주헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
고화수
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
현휘
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김성호
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711103479
과제번호 2017M3A9E2062138
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 무배양 이미징 기반 병원성 미생물체 분석을 위한 프로브 설계기술 개발
기 여 율 6/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345315539
과제번호 2018R1A6A1A03025810
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 세포간 신호교신에 의한 암제어 연구센터
기 여 율 1/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104834
과제번호 2017M3A9E2062136
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 병원성 미생물의 자기영동 분리 및 FISH 분석을 위한 바이오유체 소자 개발
기 여 율 1/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104563
과제번호 2017M3A9E2062181
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 이미징 기반 감염균 동정 및 항생제 감수성 모니터링 기술 개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집 내 시험 미생물의 양을 산출하는 단계; 및 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계를 포함하는, 시료 내 시험 미생물의 항생제 감수성을 평가하는 방법으로,

상기 제1 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 첨가된 배지에 배양하여 수득된 것이고,

상기 제2 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 포함되지 않은 배지에 배양하여 수득된 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 양을 산출하는 단계; 및 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계를 더 포함하며,

상기 제3 미생물 군집은 배양되지 않은, 시험 미생물이 포함된 군집인 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 시험 미생물의 양을 산출하는 단계는, 프로브 기반 분석법을 통해 미생물과 혼성화된 프로브로부터 방출되는 신호를 정량화하는 단계를 포함하는 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 프로브 기반 분석법은 FISH(Fluorescence in situ Hybridization) 분석법인 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계는 상기 제2 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제1 미생물 군집에 비해 낮은 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 감수성이 있는 것으로 평가하는 단계를 더 포함하는 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계는 상기 제2 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제1 미생물 군집과 동등하거나 높을 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 내성이 있는 것으로 평가하는 단계를 더 포함하는 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집은 항생제 감수성이 없는 미생물을 포함하는 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집은 0.2시간 내지 24시간 동안 배양하여 수득된 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제2 미생물 군집은 항생제를 대체하여 버퍼가 첨가된 배지에 배양하여 수득된 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 제1 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 첨가된 항생제의 농도가 변경된 배지에서 각각 배양하여 수득된 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 생체 시료, 환경 시료, 또는 식품 시료인 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집을 수득하기 전, 시험 미생물을 농축하는 단계를 더 포함하는 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 이미지 분석을 통한 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종래의 항생제 감수성 평가 방법은 시험 대상 미생물의 순수한 콜로니를 분리하는 단계, 상기 분리물을 고체 배지 상에서 또는 액상으로 배양하는 단계를 포함하여, 최종적으로 시험 대상 미생물의 생화학적 및/또는 표현형 특징의 분석을 수행함으로써 항생제 감수성을 평가하였다. 상기와 같은 전통적인 약제 감수성 시험 방법은 미생물의 분리 단계 후, 액체배지 희석 또는 한천 확산 분석을 사용하여 상기 분리물을 배양시킨 배양물의 감수성 평가를 수행하는 것이 특징이다.

[0003] 구체적으로, 액체배지 희석법은 시험 미생물의 순수 분리물을, 최소 억제 농도(MIC), 또는 MIC 유사 측정이 결정되는, 일련의 지정된 농도의 특정 항생제를 함유하는 성장 배지에 접종하는 것이다. 접종된 배지를 18 내지 24시간 동안 배양하고, 탁도, 펠렛 크기, 및/또는 발색 또는 형광 모이어티의 방출에 의해 측정되는 가시적인 성장을 관찰한다. 또한, 한천 확산 분석은 시험 미생물의 순수 분리물을 접종한 한천 배지의 표면에 항생제 함유 디스크 또는 항생제 구배 스트립을 놓는 것이다. 플레이트를 18 내지 24시간 동안 배양하고, 상기 배양 기간 동안 항생제 물질이 디스크 또는 스트립으로부터 확산되어, 항생제의 유효 농도가 디스크 또는 스트립으로부터의 반경의 함수로서 변화하는 것을 관찰한다.

[0004] 현재 FDA에 의해 승인된 항생제 감수성 시험 방법은 약 10^5 CFU/mL 미생물의 접종을 필요로 한다. 임상 샘플은 일반적으로 10^5 CFU/mL보다 훨씬 적게 함유하기 때문에, FDA 승인 시험을 임상 표본에 직접 적용하기 어렵다. 전형적으로, 임상 샘플을 배양 배지에 접종하여, 미생물의 수가 약 10^8 CFU/mL에 도달할 때까지 성장시켜야 한다. 따라서, 상기와 같은 전통적인 미생물 항생제 감수성 평가 방법은 결과를 수득하기까지 48 내지 72시간이 필요하다. 그러나, 상기와 같은 기간 동안 항생제 감수성이 없는 것으로 의심되는 미생물은 환자와 환경에 퍼지며, 환자의 건강을 위협하게 된다.

[0005] 2014년 분석된 보고서에 따르면, 2050년에는 항생제 내성균으로 인한 사망자가 암발생 사망자보다 더 많을 것이라는 분석이 있다. 또한, 구체적인 사망자의 숫자가 연간 1000만명에 이를 것이라는 예측이 존재한다. 항생제 내성에 대한 위험성 증가 및 이에 대비하기 위한 항생제 개발이 중요해짐에 따라, 항생제 감수성의 평가 방법 또한 개발의 중요성이 커지고 있다.

[0006] 전통적인 항생제 감수성 평가 방법은 평가를 위하여 미생물의 분리, 및 분리물의 배양 단계를 수행해야 하므로, 결과의 수득이 오래 걸리는 문제점이 있었다. 따라서, 감염성 미생물을 확인하고 효과적인 항생제 요법을 선택하는데 필요한 시간을 단축할 경우, 미생물의 이환율 및 사망률을 현저하게 감소시키고, 전염병 발생을 예방하며, 공격적인 미생물 감염을 가진 환자를 치료하는 비용을 줄일 수 있다.

[0007] 이러한 기술적 배경 하에서, 항생제 감수성을 단시간 내 평가할 수 있는 기술에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으나(한국등록특허 제10-1774995호), 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 시험 미생물의 동정 및 동정된 미생물을 성장시키는 단계 등의 과정없이, 프로브 기반의 이미지 분석을 통해 수 시간 안에 시료 내 항생제 감수성을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집 내 시험 미생물의 양을 산출하는 단계; 및 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계를 포함하는, 시료 내 시험 미생물의 항생제 감수성을 평가하는 방법으로,

[0010] 상기 제1 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 첨가된 배지에 배양하여 수득된 것이고,

[0011] 상기 제2 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 포함되지 않은 배지에 배양하여 수득된 것인, 항생제 감수성을 평가하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 명세서에서 용어, "시험 미생물"은 항생제에 대한 감수성의 유무를 확인하고자 하는 미생물로서, 박테리아, 바이러스, 곰팡이균, 진균, 또는 그들의 조합일 수 있다. 상기 시험 미생물은 그람 음성균 또는 그람 양성균을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 스타피로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 클레브시엘라속(*Klebsiella species*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 엔테로박터속(*Enterobacter species*)을 포함할 수 있으나, 항생제 내성을 획득할 수 있는 미생물이라면 비제한적으로 확장 적용될 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "미생물 군집"은 1 이상의 미생물이 혼합되어 있는 미생물 군락을 의미한다. 상기 미생물 군집은 시험 미생물을 포함하는 시료로부터 수득될 수 있는 것으로, 선택적으로, 상기 미생물 군집은 시험 미생물 및 항생제 내성 미생물을 포함하는 미생물 군락을 의미하는 것일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어, "시료(sample)"는 적어도 1 이상의 미생물이 포함된 시료로서, 생체 시료, 환경 시료, 또는 식품 시료일 수 있다. 상기 생체 시료는 생물로부터 수득된 액체 시료를 말하며, 혈액, 혈장, 혈청, 복수액, 골수액, 림프액, 타액, 누액, 점막액, 양수, 소변, 객담 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 환경 시료는 수질 시료 또는 토양 시료를 포함할 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 용어, "항생제 감수성"은 대상 미생물이 항생제에 의하여 사멸하고나 억제되는 정도를 지칭하는 것이며, 항생제 감수성이 낮거나 없는 미생물, 즉, 항생제 내성을 갖는 미생물은 공중 보건 또는 임상적으로 그 중요성이 매우 높은 실정이다. 상기 항생제로는 예를 들어, 아미카신(Amikacin), 아목시실린(Amoxicillin), 암피실린(Ampicillin), 아즈트레오남 (Aztreonam), 벤질페니실린(Benzylpenicillin), 칼부라닌산(Clavulanic Acid), 세파졸린(Cefazolin), 세페핌(Cefepime), 세포탁심(Cefotaxime), 세포테탄(Cefotetan), 세폭시틴(Cefoxitin), 세프포독심(Cefpodoxime), 세프타지딤(Ceftazidime), 세프트리악손(Ceftriaxone), 세푸록심(Cefuroxime), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 달포프리스틴(Dalfopristin), 도리페넴(Doripenem), 다프토마이신(Daptomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 아리트로마이신(Erythromycin), 젠타마이(Gentamicin), 이미페넴(Imipenem), 레보플록사신(Levofloxacin), 리네졸리드(Linezolid), 메로페넴(Meropenem), 미노사이클린(Minocycline), 목시플록사신(Moxifloxacin), 니트로푸란토인(Nitrofurantoin), 노르플록사신(Norfloxacin), 피페라실린(Piperacillin), 퀴누프리스틴(Quinupristin), 리팜피신(Rifampicin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 설박탐(Sulbactam), 설파메톡시졸(Sulfamethoxazole), 테리트로마이신(Telithromycin), 테트라사이클린(Tetracycline), 티카르실린(Ticarcillin), 티제사이클린(Tigecycline), 토브라마이신(Tobramycin), 트리메토프림(Trimethoprim) 및 반코마이신(Vancomycin)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "평가"는 어떤 현상에 대하여 그 수준을 판단하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서의 평가는 시험 미생물의 항생제 감수성 여부 및/또는 그 정도, 예를 들면, 항생제 내성 미생물 여부를 판단하는 것일 수 있다.

[0019] 일 구체예에서, 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계는, 상기상기 산출된 시험 미생물을 정량적으로 비교하는 것을 의미할 수 있으며, 2종 이상의 미생물이 존재할 경우에는 각 미생물의 비율을 비교하는 것일 수

있다.

[0020] 일 구체예에서, 상기 산출된 시험 미생물의 양을 비교하는 단계는, 제2 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제1 미생물 군집에 비해 낮은 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 감수성이 있는 것으로 평가하거나, 상기 제2 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제1 미생물 군집과 동등하거나 높을 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 내성이 있는 것으로 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 상기 제1 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 첨가된 배지에 배양하여 수득된 것이고, 상기 제2 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 항생제가 포함되지 않은 배지에 배양하여 수득된 것일 수 있다. 여기서, 상기 제2 미생물 군집은 제1 미생물 군집에 첨가된 항생제를 대체하여 버퍼가 첨가된 배지에서 배양된 것으로서, 예를 들어, 1X PBS, 생리식염수, 또는 1X TBS를 포함하는 배지에 배양된 것일 수 있다.

[0022] 일 구체예에서, 상기 제1 미생물 군집은 시험 미생물이 포함된 군집을 첨가된 항생제의 농도가 변경된 배지에서 각각 배양하여 수득된 것일 수 있다. 상기 항생제의 농도는 예를 들어, 순차적으로 증가 또는 감소되도록 조정될 수 있으며, 이러한 농도 변화를 통해 정량적인 항생제 감수성 판단을 수행할 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 시험 미생물(*E. coli K-12* 또는 *ER7*) 및 항생제 내성 미생물인 *E. faecalis*를 포함하는 시료를 대상으로, 일 양상에 따른 제1 및 제2 미생물 군집을 수득하여 시료 내 시험 미생물의 비율을 측정함으로써, 각 미생물의 성장 속도 등의 변수를 배제할 수 있고, 결과적으로 약 1 시간의 배양 과정만으로도 항생제 감수성 여부를 손쉽게 판별할 수 있었다.

[0025] 따라서, 상기 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집의 시험 미생물의 비율을 비교하는 단계는, 시료 내 미생물의 동정 및 상기 동정된 미생물을 성장시키는 과정을 필수적으로 포함하는 종래의 항생제 감수성 평가 방법에 비해, 이미지 기반 분석법을 통한 미생물의 비율 산출과 접목하여, 짧은 시간 내에 항생제 감수성 여부를 판별하게 할 수 있다. 구체적으로, 상기 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집은 0.2시간 내지 24시간 동안 배양하여 수득된 것일 수 있으며, 상기 배양 시간은 예를 들어, 0.2시간 내지 20시간, 0.2 시간 내지 15시간, 0.2 시간 내지 10시간, 0.2시간 내지 6시간, 0.5 시간 내지 4시간, 0.2 시간 내지 3시간, 0.5 시간 내지 24시간, 0.5 시간 내지 20시간, 0.5시간 내지 15시간, 0.5시간 내지 10시간, 0.5시간 내지 8시간, 0.5시간 내지 6시간, 0.5 시간 내지 4시간, 0.5 시간 내지 3시간, 1시간 내지 20시간, 1시간 내지 15시간, 1시간 내지 10시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 6시간, 1시간 내지 5시간, 1시간 내지 4시간, 1시간 내지 3시간, 1시간 내지 2시간, 2시간 내지 20시간, 2시간 내지 15시간, 2시간 내지 10시간, 2시간 내지 8시간, 2시간 내지 6시간, 2시간 내지 5시간, 2시간 내지 4시간, 또는 2시간 내지 3시간일 수 있으나, 이는 필요에 따라, 적의 변경 가능하다.

[0026] 일 구체예에서, 상기 시험 미생물의 비율을 산출하는 단계는 프로브 기반 분석법을 통해 미생물과 혼성화된 프로브로부터 방출되는 신호를 정량화하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "프로브(Probe)"는 미생물의 일부, 예를 들어, 미생물의 표면에 발현된 다당체, 미생물 내 유전물질(DNA, RNA 등), 미생물의 단백질에 결합하는 항체, 앱타머, DNA, RNA, PNA(Peptide Nucleic Acid), 올리고사카라이드, 펩티드 또는 단백질을 지칭할 수 있다.

[0028] 상기 프로브는 형광물질, 발색물질, 또는 화학발광물질로 표지되어 있는 것일 수 있다. 또한, 상기 형광물질은 FAM, VIC, HEX, Cy5, Cy3, SYBR Green, DAPI, TAMRA, FITC, RITC, 로다민, 프루오르다이트(Fluoredite), 프루오르프라임(FluorePrime), 및 ROX로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0029] 상기 프로브 기반 분석법은, 미생물의 유전 물질을 프로브와 혼성화시켜, 혼성화된 프로브로부터 방출되는 신호를 검출하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 미생물과 혼성화된 프로브로부터 방출되는 신호가 존재하는 부분의 신호와 그 이외의 부분의 신호를 비교함으로써 미생물의 존재 유무나 미생물의 종류를 결정할 수 있다. 또한, 미리 알고 있는 농도의 미생물을 포함하는 표준 시료를 이용해 비교함으로써 시료 내 포함된 미생물의 농도를 구하는 것일 수 있다.

[0030] 상기 프로브 기반 분석법은 조직화학, 면역조직화학, 면역형광, 발색 계내 혼성화, 형광 계내 혼성화(FISH) 등에 의해서 수행될 수 있으며, 예를들어, Single-molecule RNA FISH, Fiber FISH, Q-FISH, Flow-FISH, MA-FISH, 또는 Hybrid Fusion-FISH일 수 있다.

[0032] 일 구체예에서, 상기 방법은 시험 미생물을 포함하는 시료를 농축하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "농축"은 시료 내 미생물의 농도를 높이는 모든 활동을 의미하는 것일 수 있다. 상기 농축은, 시료에서 세균을 분리하여 농축함으로서 미생물의 검출을 가능하게 하는 것으로서, 제1 미생물 군집, 제2 미생물 군집 등을 수득하기 전에 수행하는 것일 수 있다.

[0034] 상기 농축하는 단계는 당업계에서 알려진 공지의 기술들이 비제한적으로 적용될 수 있으며, 예를 들어, 시료와 자성 입자를 접촉시켜 시료 내 포함된 미생물이 자성 입자와 결합하는 단계를 이용하여 수행될 수 있다 (한국등록특허 10-2020-0084688).

[0035] 예를 들어, 상기 "자성 입자"는 상자성을 띠는 입자를 지칭할 수 있다. 상자성이란 자기장이 존재할 때 자기장의 방향으로 약하게 자화되는 성질을 의미한다. 상기 자성 입자들은 공지된 방법을 통해서 제조한 것이거나, 또는 상업적으로 판매되는 것일 수 있다. 상기 자성 입자는 표면에 미생물 부착 인자가 코팅된 것일 수 있다. 상기 시료와 자성 입자를 접촉시켜 시료 내 포함된 미생물이 자성 입자와 결합하는 단계에서, 상기 자성 입자와 결합된 미생물을 포함하는 시료에 자기장을 인가하여 미생물을 고정화 및 농축할 수 있다. 여기서, 미생물 부착 인자는 만노스 결합 렉틴(mannose binding lectin: MBL), C 반응성 단백질(C-reactive protein: (CRP), 옵소닌, CD14, 톨 유사 수용체 4(Toll like receptor 4: TLR4), NET(Neutrophil extracellular trap), 및 사이토카인 수용체로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0037] 일 구체예에서, 상기 방법은 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율을 산출하는 단계; 및 상기 산출된 시험 미생물의 비율을 비교하는 단계를 더 포함하며, 여기서, 상기 제3 미생물 군집은 배양되지 않은, 시험 미생물이 포함된 군집인 것일 수 있다.

[0038] 상기 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율을 비교하는 단계는, 미생물 군집의 배양 과정에서 발생할 수 있는 오류를 평가하는 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율의 편차가 작거나 거의 없는 경우, 상기 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율에 기초한 항생제 감수성 관련 결과를 신뢰할 수 있는 것으로 해석할 수 있는 반면, 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율의 편차가 큰 경우, 이는 배양 조건에 따라 시험 미생물의 생존이 감소한 것으로서, 상기 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율에 기초한 항생제 감수성 관련 결과를 신뢰할 수 없는 것으로 해석할 수 있다.

[0039] 따라서, 일 양상에 따른 시료 내 시험 미생물의 항생제 감수성을 평가하는 방법은 미생물의 동정 및 동정된 미생물을 성장시키는 단계 등의 과정없이, 짧은 시간 내에 항생제 감수성을 평가할 수 있을 뿐만 아니라, 자체적인 검증 과정을 통하여, 항생제 감수성 결과에 대한 정확도를 보다 향상시킬 수 있다.

발명의 효과

[0040] 일 양상에 따른 항생제 감수성을 평가하는 방법에 따르면, 시료 내 시험 미생물의 수준, 구체적으로, 시험 미생물의 비율을 프로브 기반 분석법을 통해 정량화하여 분석함으로써, 수 시간 안에 시료 내 항생제 감수성을 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 일 실시예에 따른 항생제 감수성 평가 방법에서, 시험 미생물을 포함하는 제1 미생물 군집 및 제2 미생물 군집을 수득하는 과정을 개략적으로 나타내는 도이다.

도 2는 일 실시예에 따른 항생제 감수성 평가 방법을 통해, 항생제 감수성이 없는 시험 미생물을 포함하는 시료를 평가한 결과이다.

도 3은 일 실시예에 따른 항생제 감수성 평가 방법을 통해, 항생제 감수성이 있는 시험 미생물을 포함하는 시료를 평가한 결과이다.

도 4는 일 실시예에 따른 제1, 제2 및 제3 미생물 군집을 이용하여 항생제 감수성을 평가하는 방법을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1. 시험 미생물의 분류 및 준비**

[0045] 본 실시예에서는 항생제 감수성을 갖는 시험 미생물로서 *E. coli* K-12 균, 항생제 내성을 갖는 시험 미생물로서, *E. coli* ER7 균을 대상으로 총 2회 실험을 실시하였으며, 각각의 군집은 Cefotaxime에 대하여 내성을 갖는 *E. faecalis* 균이 포함되도록 설정하였다.

[0047] **1.1. 미생물 군집의 분류**

[0048] 본 실시예에서는 시험 미생물의 항생제 감수성을 평가하기 위하여, 시험 미생물을 포함한 미생물 군집을 3개로 분류하였다.

[0049] 구체적으로, 도 1에 도시한 바와 같이, 제1 미생물 군집은 시험 미생물을 포함하는 배지에 항생제인 Cefotaxime를 첨가하여 약 1시간 배양한 군; 제2 미생물 군집은 시험 미생물을 포함하는 배지에 식염수를 첨가하여 약 1시간 배양한 군; 및 제3 미생물 군집은 시험 미생물을 포함하는 배지를 배양하지 않은 군으로 분류하여 이들 각각을 수득하였다. 제 1 미생물 군집, 제 2 미생물 군집 및 제 3 미생물 군집의 초기 미생물의 수 또는 비율은 동일하게 설정하였다.

[0051] **1.2 시험 미생물을 포함하는 시료의 준비**

[0052] 본 실시예에서는, 시험 미생물의 항생제 감수성 평가가 가능하도록, 시험 미생물을 포함하는 시료를 준비하였다.

[0053] 구체적으로, *E. coli* K-12 균, 항생제 내성 *E. coli*인 ER7 균, Cefotaxime에 대하여 내성을 갖는 *E. faecalis*가 사용 되었고 각 균종을 OD_{600} = 0.5까지 배양시켜, 시험 미생물을 포함하는 시료를 준비하였다. 한편, 상기 시료에 항생제를 처리한 후, 상기 시험 미생물의 양을 OD_{600} 내지 이미징으로 정량화를 수행하였으며, 이 경우, 이미징 과정에서는 3,000g로 3분 동안 원심분리기를 통하여 시료를 10배 농축하고 Vectabond로 코팅된 유리 기판에 고정하여, 실험을 수행하였다.

[0055] **실시예 2. FISH 분석법을 통한 항생제 감수성 평가**

[0056] 본 실시예에서는 상기 분류 및 수득된 미생물 군집에서, 시험 미생물의 비율을 정량화하였으며, 이에 기초하여 시험 미생물의 항생제 감수성 여부를 평가하였다.

[0057] 박테리아의 시료 고정을 위하여 아세톤 및 Vectabond가 50:1로 혼합된 용액을 샘플 접시에 떨어뜨렸다. 다음으로, 상기 샘플 접시를 5분 동안 상온에서 배양한 다음, 3차수로 2 내지 3회 세척 후 수분을 완벽히 제거하였다. 이후, 상기 실시예 1의 시험 미생물 시료를 코팅된 샘플 접시 위에 떨어트린 후, 30분 동안 실온에서 배양한 후, 잔여 시료를 3차수로 세척하였다. 다음으로, 3.7% 포름알데히드 용액을 시료가 고정된 샘플 접시에 떨어트린 후 실온에서 30분 동안 고정하고, 뉴클라아제(nuclease)가 없는 3차수로 2 내지 3회 세척하였다. 다음으로, PNA 프로브의 박테리아 투과성을 높이기 위하여 뉴클라아제가 없는 3차수로 제작된 리소자임(lysozyme) 5 mg/ml으로 처리하고 30분 동안 37° C 에서 배양하였다. 다음으로, 10% (wt/vol) Dextran sulfate, 10 mM NaCl, 30% (vol/vol) formamide, 0.1% (vol/vol) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone, 0.2 % (wt/vol) Ficoll, 0.1% (wt/vol) sodium pyrophosphate, 5 mM disodium EDTA, 100 nM E. coli PNA 프로브 및 100 nM E. faecalis PNA 프로브를 포함하는 혼합용액 100 μL를 상기 샘플 접시의 바닥에 고정된 박테리아 시료에 55° C에서 30분간 처리하였다. 이후, 15% (vol/vol) formamide, 5 mM Tris base, 15 mM NaCl 및 0.1% Hoechst 33342가 포함된 200 μL의 세척 용액을 55° C에서 두 번 15분간 처리하여 잔여 PNA 프로브를 씻어내고, 뉴클라아제가 없는 3차수로 희석된 1X PBS용액으로 세척하였다. 최종으로 뉴클라아제가 없는 3차수로 희석된 2xSSC 용액에 시료를 담근 후 공초점 형광현미경으로 시료의 형광 영상을 획득하였다.

[0059] 도 2는 일 실시예에 따른 항생제 감수성 평가 방법을 통해, 항생제 감수성이 없는 시험 미생물을 포함하는 시료를 평가한 결과이고; 도 3은 항생제 감수성이 있는 시험 미생물을 포함하는 시료를 평가한 결과이다.

[0060] 도 2에 나타낸 바와 같이, 항생제 감수성이 없는 시험 미생물의 경우, 제 제 1 미생물 군집 내의 시험 미생물의 비율이 유지되었던 반면, 도 3에 나타낸 바와 같이, 항생제 감수성이 있는 시험 미생물의 경우, 제 1 미생물 군집 내의 시험 미생물의 비율이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 전체 균 대비 시험 미생물의 비율의 측정을 통해, 단시간 내 시험 미생물의 감수성을 확인할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0061] 또한, 도 4는 상기 실시예 1과 같이, 제1, 제2 및 제3 미생물 군집을 이용하여 항생제 감수성을 평가하는 방법을 나타낸 결과이다.

[0062] 구체적으로, 도 4에 나타낸 바와 같이, 두 개의 미생물(*E. coli* 및 *E. faecalis*) 군집이 혼합되어 있는 시료를 제1, 제2 및 제3 미생물 군집으로 분류하고, 제2 미생물 군집에 항생제(cefotaxime)을 처리하여 1시간 동안 배양한 경우, *E. coli* 및 *E. faecalis* 의 비율이 변화하는 결과를 나타낸 것이다. 일반적으로, 각 미생물의 성장 속도 및 생리적 상태에 따라서 성장 속도에 차이가 있을 수 있으나 1시간 배양은 군집의 개체 차이를 확인하기에는 부족한 시간이므로, 결과적으로 일 양상의 항생제 감수성 평가 방법의 상기 제1 미생물 군집 및 제3 미생물 군집 내 시험 미생물의 비율을 비교하는 단계는, 미생물 군집의 배양 과정에서 발생할 수 있는 오류를 평가하는 역할을 할 수 있다. 따라서, 초기 미생물 군집인 제3 미생물 군집과 항생제 없이 배양한 제2 미생물 군집의 경우 미생물의 양 또는 비율에 큰 차이를 보이지 않았으므로, 배양이 오류 없이 진행되었다고 판단하고 항생제 감수성 평가를 진행하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 것과 같이, 항생제를 처리하여 배양한 제1 미생물 군집의 경우 항생제 감수성을 보이는 *E. coli* K-12 의 개체가 급격하게 감소하고, 반면에 내성을 보이는 E. faecalis 는 계속 성장하여 비율이 크게 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

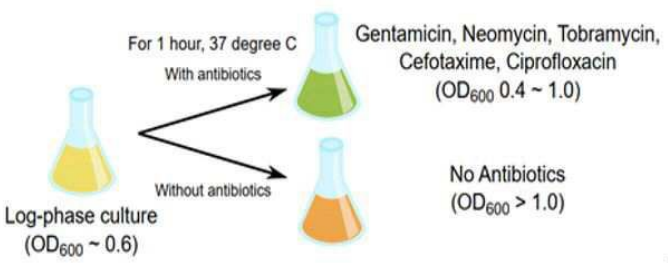
[0064] 이러한 결과는, 제1 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제2 미생물 군집에 비해 낮은 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 감수성이 있는 것임을 의미하고, 상기 제2 미생물 군집 내 시험 미생물 비율이 제1 미생물 군집과 동등하거나 높을 경우, 상기 시험 미생물은 항생제 내성이 있는 것임을 의미한다. 더불어, 제 2 미생물 군집 및 제3 미생물 군집을 비교하였을 때, 미생물 비율에 큰 차이가 보이면 배양에 문제점이 있는 것으로 판단할 수 있음을 의미한다.

[0065] 따라서, 본 발명의 평가 방법에 의하면, 배양의 문제점에 의한 항생제 감수성 검사의 정확도 저하 문제가 없이, 1종 이상의 미생물이 존재하는 시료에서도 약 1 시간의 배양만으로 시험 미생물의 항생제 감수성 여부를 신속하고 정확하게 판단할 수 있다.

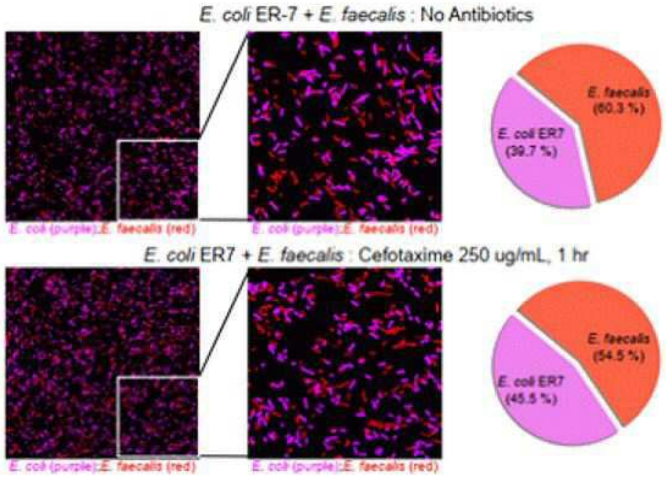
[0067] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

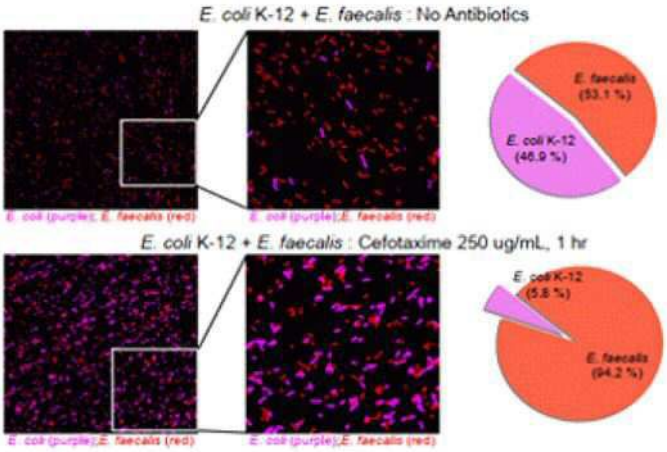
도면1



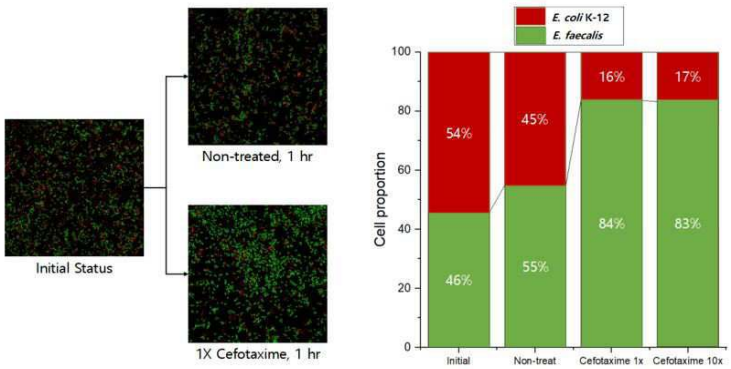
도면2


E. coli ER-7 + E. faecalis : No Antibiotics
E. faecalis (60.3 %)
E. coli ER7 (39.7 %)
E. coli (purple);E. faecalis (red)
E. coli ER7 + E. faecalis : Cefotaxime 250 ug/mL, 1 hr
E. faecalis (54.5 %)
E. coli ER7 (45.5 %)
E. coli (purple);E. faecalis (red)

도면3


E. coli K-12 + E. faecalis : No Antibiotics
E. faecalis (53.1 %)
E. coli K-12 (46.9 %)
E. coli (purple);E. faecalis (red)
E. coli K-12 + E. faecalis : Cefotaxime 250 ug/mL, 1 hr
E. coli K-12 (5.8 %)
E. faecalis (94.2 %)
E. coli (purple);E. faecalis (red)

도면4


Initial Status
Non-treated, 1 hr
1X Cefotaxime, 1 hr
E. coli K-12
E. faecalis
Cell proportion
100
80
60
40
20
0
54%
46%
45%
55%
16%
84%
17%
83%
Initial
Non-treat
Cefotaxime 1x
Cefotaxime 10x