



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월14일

(11) 등록번호 10-2189833

(24) 등록일자 2020년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0080757

(22) 출원일자 2019년07월04일

심사청구일자 2019년07월04일

(65) 공개번호 10-2020-0004767

(43) 공개일자 2020년01월14일

(30) 우선권주장

1020180077796 2018년07월04일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR101439918 B1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705

장 다마센 우위제이마나

르완다, 키갈리, 가켄에 디스트릭트, 물리병원

변정현

서울특별시 마포구 백범로 239, 신공덕 이편한세상 103-1204

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 18 항

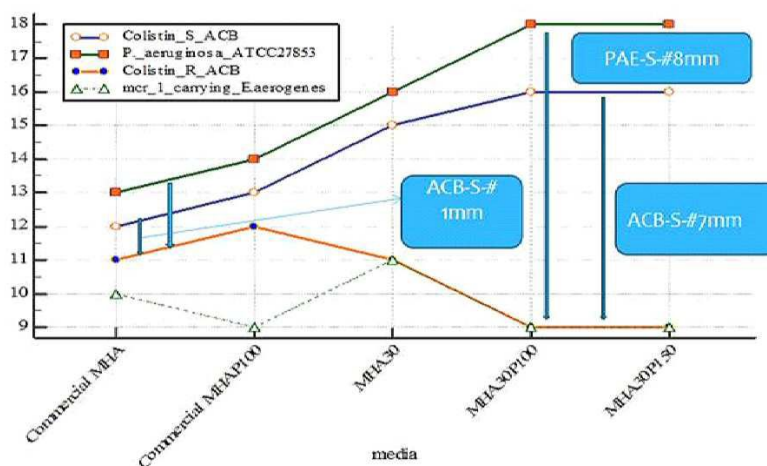
심사관 : 김현주

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

(57) 요약

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 $\mu\text{g/ml}$ 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌

Vaara. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiology Reviews. 1992 Sep;56(3):395-411.
W02013016529 A2
Lee et al., Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. Journal of Microbiological Methods 83 (2010) 149-152
Mohammadzadeh et al., Comparison of Agar Dilution, Broth Dilution, Cylinder Plate and Disk Diffusion Methods for Evaluation of Anti-leishmanial Drugs. Iran J Parasitol. 2012; 7(3): 43-47

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 No.2017M3A7B4039936
부처명 Ministry of Science and ICT
과제관리(전문)기관명 Yonsei University Office of Research
연구사업명 Nano Material Technology Development Program
연구과제명 전기바이오센서 모듈개발을 위한 유전자, 세균, 도말검체제공 및 임상평가(Provision of gene, bacteria, swabspecimen to develop electric biosensor modules and clinical evaluation)

기 여 율 1/3
과제수행기관명 National Research Foundation of Korea
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C-1807-020017
부처명 Ministry of Health & Welfare
과제관리(전문)기관명 Yonsei University Office of Research
연구사업명 Korea Health Technology R&D Project
연구과제명 신규 화합물의 in vitro 항균 활성 평가 및 내성 기전 연구
기 여 율 1/3
과제수행기관명 Korea Health Industry Development Institute (KHIDI)
연구기간 2017.04.10 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H-GUARD_2014M3A6B2060509
부처명 Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP)
과제관리(전문)기관명 Yonsei University Office of Research
연구사업명 Global Frontier Project
연구과제명 감염질환 진단검사 평가를 위한 기반 시스템구축(Development of software and diagnostic test evaluation system for patients with infectious diseases)
기 여 율 1/3
과제수행기관명 BioNano Health-Guard Research Center
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및

프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 $\mu\text{g/ml}$ 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 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% CO₂, 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.

발명의 설명

기술 분야

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.

배경 기술

[0001]

- [0002] 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.
- [0003] 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.
- [0004] 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.
- [0005] 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 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 일 목적은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위하여 디스크 확산법(disk diffusion method)에 사용될 수 있는 배지 조성물을 제공하고자 한다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 배지 조성물을 이용하여 디스크 확산법에 의해 항생제 감수성을 평가하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0008] 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.

과제의 해결 수단

- [0009] 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.
- [0010] 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 스테노트로포모나스 말토포필리아(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.
- [0011] 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 있

다.

- [0012] 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.
- [0013] 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.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L; 및
- [0016] 프로타민(protamine) 또는 이의 염 50 내지 200 $\mu\text{g/ml}$ 및 구아니딘 또는 이의 염 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 중 적어도 하나;를 포함하는, 디스크 확산(disk diffusion method)용 배지 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명에서 상기 배지 조성물은 항생제에 대한 감수성을 평가하기 위한 디스크 확산용 배지 조성물일 수 있다.
- [0018] 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 양성 박테리아로부터 생산된다. 이러한 폴리믹신은 그람 음성 박테리아 세포 외막의 지질다당류(lipopolysaccharide)에 결합한 뒤 세포 외막 및 내막을 파괴하여 항생 효과를 발휘한다.
- [0019] 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.
- [0020] 또한, 본 발명의 배지 조성물은 프로타민 또는 이의 염; 및 구아니딘 또는 이의 염; 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 프로타민 염으로는 프로타민 황산염(protamine sulfate)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 상기 구아니딘 염으로는 구아니딘 하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride)인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 배지 조성물에서 상기 프로타민 또는 이의 염은 50 내지 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 50 내지 150 $\mu\text{g/ml}$, 보다 바람직하게는 80 내지 120 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 프로타민 또는 이의 염의 함량이 50 $\mu\text{g/ml}$ 미만인 경우 항생제의 확산력 증진 효과가 미미하고, 프로타민 또는 이의 염의 함량이 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 경우 프로타민 또는 이의 염으로 인하여 박테리아의 성장이 억제되거나 사멸하게 됨에 따라 항생제 감수성을 평가함에 있어 정확도가 현저히 떨어지게 된다.
- [0024] 본 발명의 배지 조성물에서 상기 구아니딘 또는 이의 염은 5 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 300 $\mu\text{g/ml}$ 또는 25 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 구아니딘 또는 이의 염의 함량이 5 $\mu\text{g/ml}$ 미만인 경우 항생제의 확산력 증진 효과가 미미하고, 구아니딘 또는 이의 염의 함량이 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과하는 경우 구아니딘 또는 이의 염으로 인하여 박테리아의 성장이 억제되거나 사멸하게 됨에 따라 항생제 감수성을 평가함에 있어 정확도가 현저히 떨어지게 된다.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 본 발명의 배지 조성물은 전분을 1 내지 2 g/L의 양으로, 바람직하게는 1.25 내지 1.75 g/L의 양으로 더 포함할

수 있다.

- [0028] 본 발명의 배지 조성물은 잔부 용매, 바람직하게는 물을 포함할 수 있다.
- [0029] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 배지 조성물은 아가(agar) 1.5 내지 10 g/L, 프로타민 또는 이의 염은 50 내지 200 μ g/ml; 및 구아니딘 또는 이의 염은 5 내지 500 μ g/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.
- [0030] 본 발명의 배지 조성물은 25 $^{\circ}$ C의 상온에서 pH가 7 내지 7.5일 수 있고, 바람직하게는 7.2 내지 7.4일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물에 목적하는 균주를 도말하는 단계; 및
- [0033] 상기 균주가 도말된 배지 조성물 상에 항생제를 포함하는 시편을 위치시키는 단계를 포함하는, 항생제 감수성을 평가하는 방법에 관한 것이다.
- [0034] 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 플레이트 일 수 있다.
- [0035] 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.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명에서 상기 시편을 항생제 및 용매를 포함하는 용액에 침지시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 항생제는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다.
- [0039] 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.
- [0040] 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 μ g/ml, 또는 0.5 내지 100 μ g/ml의 양으로 포함될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서는 상기 시편을 용액 내에 침지시켜 20 내지 25 $^{\circ}$ C의 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.
- [0042] 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.
- [0043] 본 발명에서는 필요에 따라, 상기 배지 조성물 상에 시편을 위치시킨 뒤 항생제의 전-확산(pre-diffusion)을 위하여 4 $^{\circ}$ C에서 1분 내지 24시간, 10분 내지 12시간, 1시간 내지 6시간, 또는 1시간 내지 3시간 동안 유지시키는 단계를 수행할 수 있다.
- [0044] 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% CO₂, 37 $^{\circ}$ C의 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.

- [0045] 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.
- [0046] 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.
- [0047] 본 발명에서 상기 감수성의 측정 대상이 되는 항생제로는 폴리믹신(polymyxin)일 수 있고, 보다 바람직하게는 콜리스틴(colistin)일 수 있다.

발명의 효과

- [0048] 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

- [0049] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 일반 뮐러-힌턴 아가 배지; 일반 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가한 배지; 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정된 뮐러-힌턴 아가 배지; 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정된 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가한 배지; 및 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도로 조정된 뮐러-힌턴 아가 배지에 프로타민을 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 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.
- 도 2의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 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.
- 도 2의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 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.
- 도 3의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성 슈도모나스 에로지노사 ATCC27853를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4의 (b)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 mcr-1-수반하는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제 영역의 사진을 나타낸 것이다.
- 도 5의 (a)는 본 발명의 실시예 4에서 아가를 17 g/L(100%)의 농도 및 프로타민을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-내성 아시네토박터(*Acinetobacter*, ACB)를 배양한 뒤 디스크로부터 확산된 성장 억제

영역의 사진을 나타낸 것이다.

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

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

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

도 7은 본 발명의 실시예 4에서, 본 발명의 배지 조성물을 사용하여 얻어진 디스크 확산법의 결과와 MIC 결과를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 500 μ g/ml의 농도로 포함하는 배지 조성물에 콜리스틴-감수성(S) 및 -내성(R) 아시네토박터 바우만니(ABA) 균주, 콜리스틴-감수성(S) 또는 -내성(R) 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*; 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.

도 9는 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 50 μ g/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.

도 10은 본 발명의 실시예 5에서 아가를 5.1 g/L(30%)의 농도 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 5 μ g/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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예

[실시예 1]

뮐러-헌튼 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 μ g/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.

표 1

균주		콜리스틴 억제 영역의 직경(mm)							
		100% 아가	90% 아가	80% 아가	70% 아가	60% 아가	50% 아가	40% 아가	30% 아가
콜리스틴 내성	ACB-R	11	12	12	11	13	10	11	11
	mcr-1	10	10	9	10	10	11	10	11

콜리스틴 감수성	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

[0058] 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.

[0060] [실시예 2]

[0061] 상기 실시예 1과 같이 필러-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 필러-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.

[0062] 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.

[0064] [실시예 3]

[0065] 상기 실시예 1과 같이 필러-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.

표 2

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

[0067]

[0068]

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.

[0069]

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

[0071]

[실시예 4]

[0072]

I 단계

[0073]

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

[0074]

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. 윌러-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.

[0076]

2. 결과

[0077]

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.

[0078] 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 윌러-힌턴 배지에 포함된 17 g/L의 30% 농도인 5.1 g/L의 농도로 확정하였다.

[0080] II 단계

[0081] 1. 변형된 윌러-힌턴 배지에서 억제 영역의 직경과 MIC 사이의 상관관계의 결정

[0082] 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.

[0083] 프로타민에 증류수를 첨가하여 이를 완전히 용해시킨 뒤 오토클레이브(autoclave) 전에 MHA에 첨가하였다. 10mg 콜린 디스크(BD diagnostics)를 사용하여 35 °C의 온도 및 5 부피% CO₂ 조건 하에서 16 내지 18 시간 동안 배양하면서 콜린 디스크 확산 실험을 수행하였다. MHA30P는 상업적 MHA와 비교하여 상대적으로 부드러워, 접종 시 배지에 흡집이 생기는 것을 방지하기 위하여 주의를 요한다. 멸균 면봉을 3ml 및 부유액의 0.5 McFarland에 담갔다.

[0085] 2. 분석 및 해석

[0086] 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.

[0088] 3. 결과

[0089] 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 7에서 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.

[0090] 본 발명에서 아가가 5.1 g/L의 농도로 포함되고, 프로타민이 100 µg/ml의 농도로 포함되는 배지 조성물을 사용하는 경우 콜리스틴의 아가로써 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.

[0092] [실시예 5]

[0093] 윌러-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 pneumoniae*; 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.

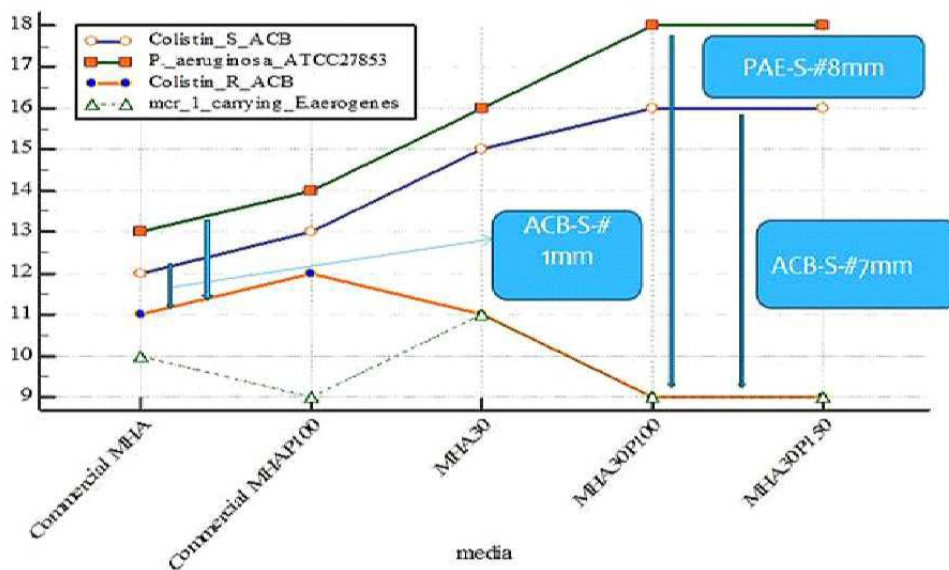
표 3

아가 농도	구아니딘 하이드로클로 라이드 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%	500 μ g/ml	15	15	10	9	16	17	14	10	16	14	13	12
	50 μ g/ml	15	15	10	9	16	16	16	12	15	16	13	12
	5 μ g/ml	15	15	10	9	17	17	16	12	16	16	12	12

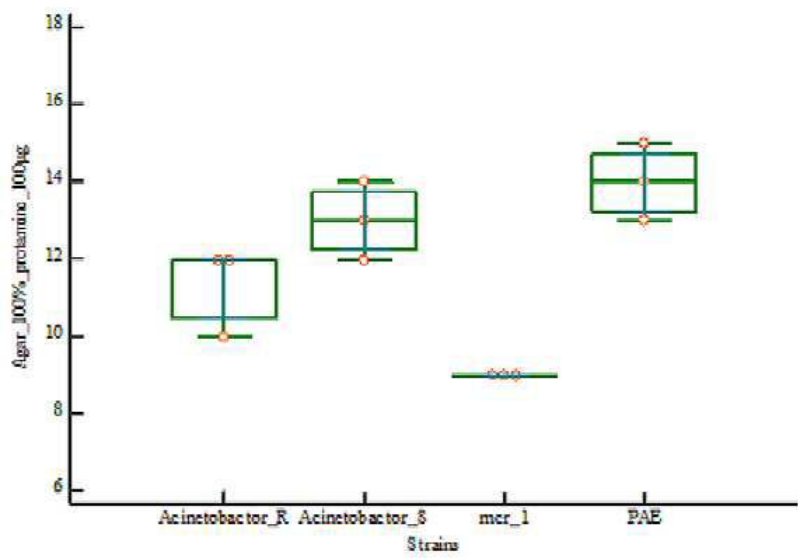
상기 표 3 및 도 8 내지 10에서 보는 바와 같이, 아가 농도를 일반적 필러-힌턴 배지의 아가 농도(17 g/L)의 30% 양인 5.1 g/L로 조정하고, 구아니딘 하이드로클로라이드를 5 내지 500 μ g/ml의 양으로 첨가하자 콜리스틴 내성 균주에서는 성장 억제 영역의 크기에 변화가 없었지만, 콜리스틴 감수성 균주에서는 성장 억제 영역의 직경이 증가한 것을 확인할 수 있었고, 특히 5 내지 50 μ g/ml의 양으로 첨가하였을 때 균주의 성장 또한 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

도면

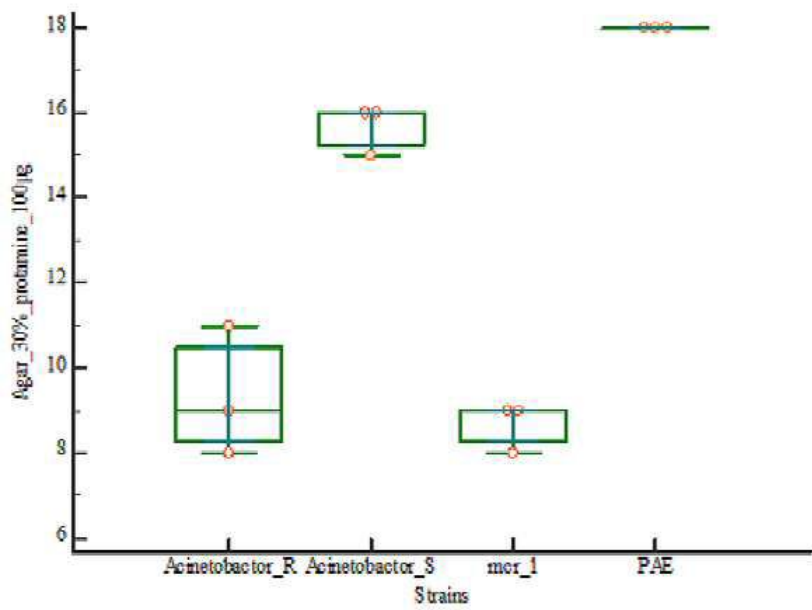
도면1



도면2

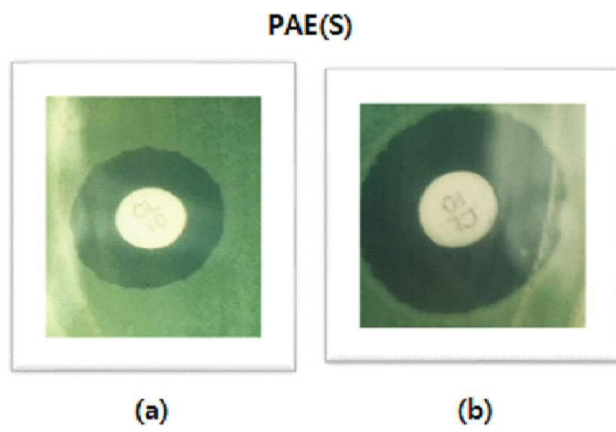


(a)

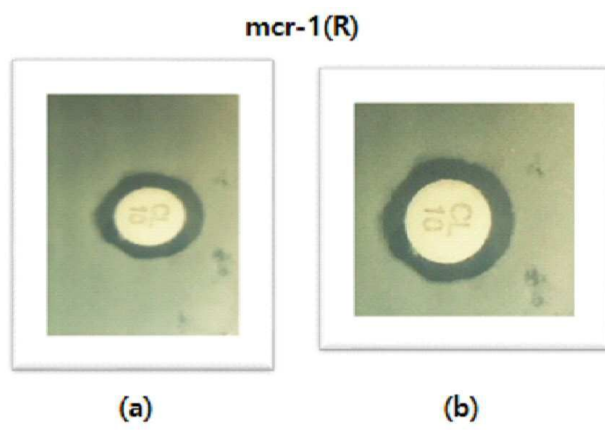


(b)

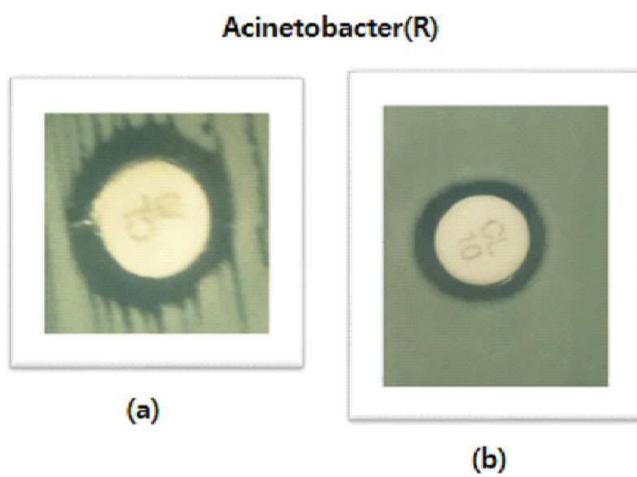
도면3



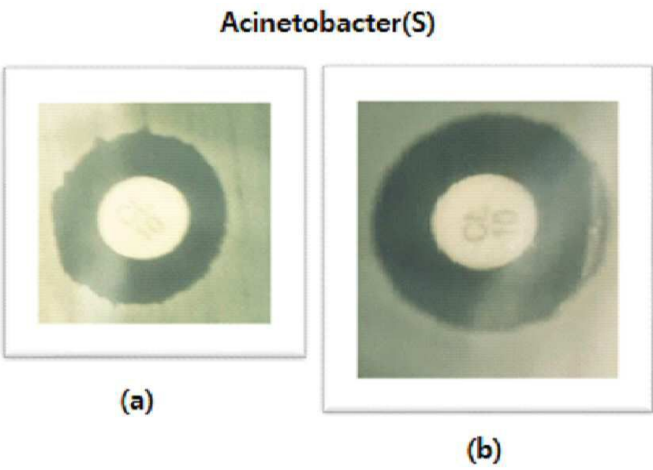
도면4



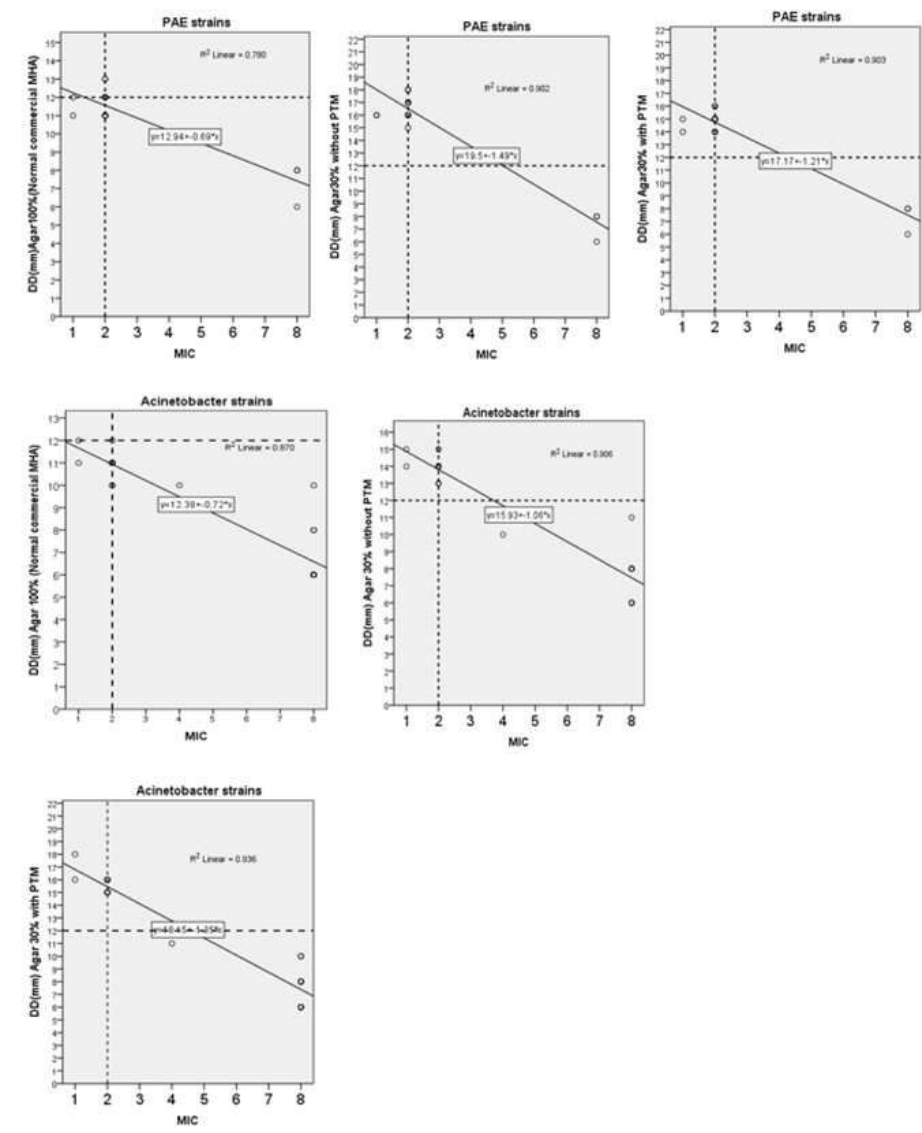
도면5






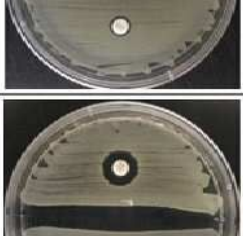



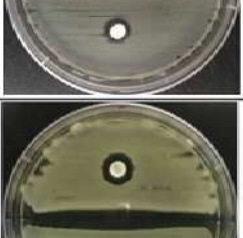
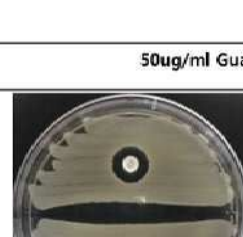



도면6





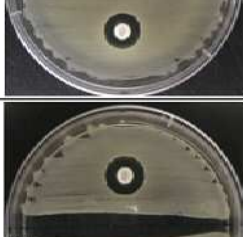
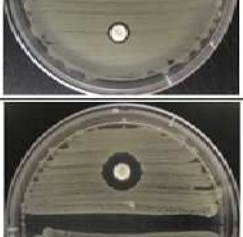
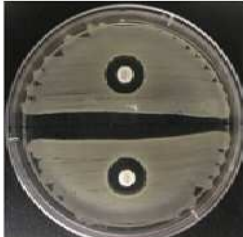
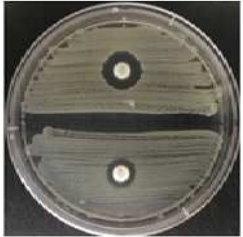
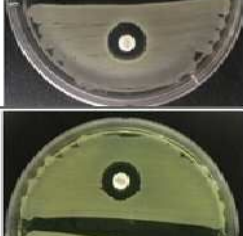
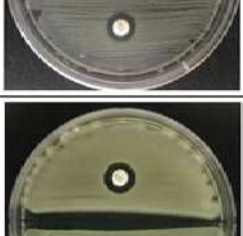




도면7





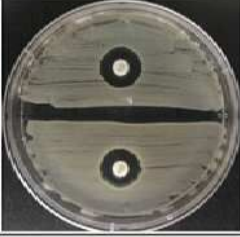

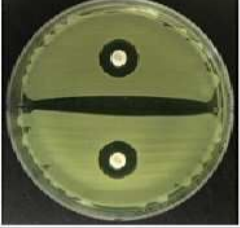
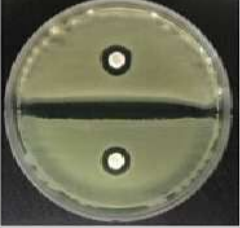
도면8

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

도면9

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

도면10

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