



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월30일

(11) 등록번호 10-2184637

(24) 등록일자 2020년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6813 (2018.01) **C12Q 1/689** (2018.01)
G16B 45/00 (2019.01) **G16B 5/00** (2019.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6813 (2018.05)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-7003372
(22) 출원일자(국제) 2017년07월28일
심사청구일자 2019년01월31일
(85) 번역문제출일자 2019년01월31일
(65) 공개번호 10-2019-0022871
(43) 공개일자 2019년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2017/008168
(87) 국제공개번호 WO 2018/026141
국제공개일자 2018년02월08일
(30) 우선권주장
1020160099515 2016년08월04일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090121611 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
주식회사 옵티팜
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명6로 63
(72) 발명자
왕혜영
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교원주
캠퍼스 환경친화기술센터 305호
김현일
서울특별시 성북구 아리랑로6길 30번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인키

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 **퀀타매트릭스 어세이 플랫폼 기반 결핵 및 비결핵 항산균의 검출 및 동정과 결핵균의 리팜핀 내성여부를 동시 확인할 수 있는 진단법 및 그 키트**

(57) 요약

본 발명은 퀀타매트릭스 어세이 플랫폼 기반 결핵 및 비결핵 항산균의 검출 및 동정과 결핵균의 리팜핀 및 아이나 내성여부를 동시 확인할 수 있는 진단법 및 그 키트에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G16B 45/00 (2019.02)

G16B 5/00 (2019.02)

C12Q 2563/107 (2013.01)

(72) 발명자

박철세

충청북도 청주시 흥덕구 증안로 77 현대2차아파트
208동 203호

이혜영

강원도 원주시 시청로 92, 309-105 (무실동, 무실
주공3단지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

서열번호 1 내지 서열번호 12의 프라이머 및

서열번호 13 내지 68의 올리고머 프로브가 커플링된 디스크를 포함하는 결핵균 및 비결핵 항산균 검출과 동정 및, 결핵균의 리팜핀, 및 아이나 내성 여부를 동시에 확인하기 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 검출 및 확인 균주는 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv, 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 스크로풀라시움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 켈로나이(*M. chelonae*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 얼서런스(*M. ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 마이코박테리움 제나벤스(*M. genavense*), 마이코박테리움 시미에(*M. simiae*), 마이코박테리움 테라(*M. terrae*), 마이코박테리움 넌크로모제니쿰(*M. nonchromogenicum*), 마이코박테리움 켈라툼(*M. celatum*), 마이코박테리움 고르도나이(*M. gordonae*), 마이코박테리움 줄게일(*M. szulgai*), 마이코박테리움 무코제니쿰(*M. mucogenicum*), 마이코박테리움 오박넨스(*M. aubagnense*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 펠레(*M. phlei*), 마이코박테리움 스메그마티스(*M. smegmatis*), 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*), 마이코박테리움 페레그리눔(*M. peregrinum*) 및 마이코박테리움 프라제센스(*M. flavescens*)으로 구성된 균으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 결핵균 및 비결핵 항산균 검출과 동정 및, 결핵균의 리팜핀, 및 아이나 내성 여부를 동시에 확인하기 위한 키트.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 프라이머는 바이오틴이 표시된 것을 특징으로 결핵균 및 비결핵 항산균 검출과 동정 및, 결핵균의 리팜핀, 및 아이나 내성 여부를 동시에 확인하기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 키타매트릭스 어세이 플랫폼 기반 결핵 및 비결핵 항산균의 검출 및 동정과 결핵균의 리팜핀 내성 여부를 동시에 확인할 수 있는 진단법 및 그 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)이 원인이 되어 발생하는 만성 감염성 질환이고 우리나라에서 결핵의 유병률은 지속적으로 감소하는 추세이나 외국에 비해 높은 편이다. 또한, 효과적인 항결핵제가 사용되어 왔음에도 불구하고 다제내성 결핵 및 광범위내성 결핵 등 난치성 결핵이 증가함에 따라 아직도 세계적으로 결핵 환자가 매년 800만 명이 발병하고 결핵으로 인해서 200만 명이 사망하고 있다. 따라서 치료가 어려운 난치성 결핵균의 내성 여부를 신속하게 판별하는 것이 환자의 효과적인 치료와 생존에 필수적이다. 결핵의 원인균으로는 결핵균뿐만 아니라 외국의 경우 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 빈도가 높은 지역에서는

항산균 도말 양성 객담의 30%에서 50%까지 비결핵 항산균이 분리되고 있으며 선진국화될수록 비결핵 항산균에 의한 결핵환자의 발생이 증가하는 것으로 보고되면서 마이코박테리아 균동정이 매우 중요한 문제가 되고 있다 [Wright PW, Wallace RJ Jr, Wright NW, Brown BA, Griffith DE. J Clin Microbiol 1998;36:1046-9; Marras TK and Daley CL. Clin Chest Med 2002;23:553-67; Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Thorax 2000;55:210-8].

[0003] 국내의 경우 비결핵 항산균 질환의 빈도가 낮다고 알려져 있었기 때문에 항산균 도말양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하고 항결핵제 치료를 시행하는 것이 일반적이었으나, 국내에서도 항산균 도말 양성 객담의 10.3-12.2%까지 비결핵 항산균의 검출이 보고되어 왔으나 최근에는 30% 수준까지 그 비율이 높아지고 있는 추세이다 [Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon K, Suh GY, Chung MP, et al. Tuberc Respir Dis 2003;54:22-32]. 또한 비결핵 항산균은 면역 기능 저하자에서 질병을 일으킬 수 있고 진단이 쉽지 않으며 균종에 따라 자연적으로 가지는 약제내성이 다르므로 비결핵 항산균에 의한 결핵의 경우 그 치료법이 결핵균에 의한 결핵의 치료법과 다를 수 있다 [Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. J Korean Med Sci 2005;20:913-25; Wagner D and Young LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. Infection 2004;32:257-70].

[0004] 그러므로 결핵균과 비결핵 항산균을 신속하게 구별할 수 있는 적절한 검사방법이 요구되고 있다.

[0005] 결핵의 진단에는 보편적으로 항산균 도말검사와 배양검사를 이용해왔다. 항산균 도말검사는 신속하게 결과를 얻을 수 있고 기법이 간편하다는 장점이 있으나 민감도와 특이도가 떨어지며 결핵균과 비결핵 항산균을 구분할 수 없다는 단점이 있으며 배양검사는 결핵진단의 표준법으로 결핵을 진단하는 가장 정확한 방법이지만 천천히 자라는 결핵균의 특성상 시간이 오래 걸린다는 단점이 있으며, 장기간 배양을 하기 때문에 다른 균에 의해 오염이 되는 경우가 많다 [Yang HY, Lee HJ, Park WY, Lee KK, Suh JT. Korean J Lab Med 2006;26:174-8]. 최근 결핵균 배양시간을 단축하기 위해서 액체배지를 이용한 자동화 검사법이 등장하였으나 이 방법 역시 결핵균과 비결핵 항산균을 구별할 수 없기 때문에 별도의 동정과정의 필요하다는 단점이 있다 [Yang HY, Lee HJ, Park WY, Lee KK, Suh JT. Korean J Lab Med 2006;26:174-8]. 또한 약제 내성 여부를 판별하기 위해 Golden standard로 사용되고 있는 미생물 기반의 진단법은 환자로부터 채취한 객담에서 결핵균을 배양한 후, 다시 약제가 포함된 배지에 배양하여 내성여부를 판단하기에 최소 4 ~ 8주가 경과해야 약제 내성 여부를 판별할 수 있다.

[0006] 내성결핵균에 의한 치료지연은 내성결핵균의 지역 감염확산으로 이어지므로, 초기 결핵진단시 결핵균의 내성 여부를 판단하는 것은 매우 중요하고 이를 위해서는 신속하게 내성여부를 확인할 수 있는 분자진단검사법이 요구되고 있다.

[0007] 최근에는 분자진단 기술이 발달되면서 이를 이용한 결핵 진단법들이 많이 개발되었다 [Chakravorty S and Tyagi JS. Novel multipurpose methodology for detection of Mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR. J Clin Microbiol 2005;43:2697-702; Kim YJ, Park MY, Kim SY, Cho SA, Hwang SH, Kim HH, et al. Korean J Lab Med 2008;28:34-8]. 결핵의 확실한 진단방법은 결핵균에 의한 감염을 증명하는 것이므로 임상 검체에서 직접 MTB를 검출하는 방법이 가장 확실하다.

[0008] 따라서 PCR [Yang HY, Lee HJ, Park WY, Lee KK, Suh JT. Korean J Lab Med 2006;26:174-8; Chakravorty S and Tyagi JS. J Clin Microbiol 2005;43:2697-702],

[0009] 실시간 PCR [Kim YJ, Park MY, Kim SY, Cho SA, Hwang SH, Kim HH, et al. Korean J Lab Med 2008;28:34-8; Jung CL, Kim MY, Seo DC, Lee MA. Korean J Clin Microbiol 2008;1:29-33],

[0010] 교잡화 [Makinen J, Marjamaki M, Marttila H, Soini H. Clin Microbiol Infect. 2006;12:481-3; Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. J Clin Microbiol. 2004;42:3083-8; Sanguinetti M, B Posteraro, F Ardito, S Zanetti, A Cingolani, L Sechi, et al. J Clin Microbiol. 1998;36:1530-3; Tortoli, E, A Mariottini, and G Mazzarelli. J Clin Microbiol. 2003;41:4418-20], 및

[0011] 올리고뉴클레오타이드 어레이 [Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, et al. J Clin Microbiol 2005;43:1782-8] 등, 신속하면서도 민감도와 특이도가 높은 분자생물학적 방법을 이용하여 환자로부터 분리한 직접 검체에서 결핵균을 검출하는 방법의 이용이 점차 늘어나고 있는 추세이다. 또한 비결핵 항산균의 동정법으로 많이 사용되고 있는 방법 중의 하나가 PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis (PRA) 방법이다 [18]. PRA 방법은 결핵균과 비결핵 항산균의 동정이 가능한 유전자 부위를 PCR로 증폭한 후, 적절

한 제한효소를 처리하여 그 절편의 양상을 보고 균을 동정하는 방법이다[Lee HY, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. J Clin Microbiol. 2000;38:2966-71; Bannalilar AS, Verma R. Indian J Med Res. 2006;123:165-72;Aravindhan V, Sulochana S, Narayanan S, Paramasivam CN, Narayanan PR. Indian J Med Res. 2007;126:575-9].

[0012] 그러나 PRA방법은 결핵균과 비결핵 항산균 등 두 가지 이상의 균이 섞여 있는 경우에는 제한효소를 처리한 절편의 양상이 복합적으로 나타나기 때문에 동정이 불가능하다는 단점이 있다. 이러한 불편함을 보완하고자 최근에는 결핵균과 비결핵 항산균을 동시에 진단 및 동정할 수 있으며, 다양한 균이 섞여있는 경우에도 동정이 가능한 QuantaMatrix assay Platform (QMAP) 기반 분자진단검사법을 개발하였다. QMAP은 퀀타매트릭스사의 원천기술(특허 등록번호 1011013100000 (2011.12.26) / 1015823840000 (2015.12.28) 로 suspension array technology를 기반으로 하고 있으며 50 μ m 크기의 자성을 띠고 있는 디스크 (Microdisk)에 프로브를 결합시키고 PCR산물과 반응시킨 후, 돌연변이를 여부를 형광으로 확인할 수 있는 검사법으로 QMAP의 가장 큰 특징은 디스크에 고유의 코드를 새겨 이 코드로 간섭현상 없이 디스크를 구별하며 기술적으로 1024개의 코드가 가능하므로 각각 고유의 코드가 새겨진 1024종의 디스크를 이용한 다중검사가 가능하며 모든 과정이 96 well plate에서 진행되기 때문에 high throughput이 가능한 시스템이다 (도 1).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 결핵 및 비결핵 항산균의 검출 및 동정과 결핵균의 리팜핀 내성여부를 확인할 수 있는 진단법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 신규한 결핵 및 비결핵 항산균의 검출 및 동정과 결핵균의 리팜핀 내성여부를 확인할 수 있는 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 a)검체 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;b)서열번호 1 내지 서열번호 12의 프라이머를 사용하여, 상기 DNA로부터 PCR 증폭하는 단계;및 c) 서열번호 13 내지 68의 올리고머 프로브가 커플링된 디스크와 상기 단계 b)에서 얻어진 PCR 증폭산물을 하이브리드형성시키는 후,퀀타매트릭스 어세이 플랫폼 소프트웨어를 통하여 상기 디스크의 이미지를 측정하는 단계를 포함하는 결핵균 및 비결핵 항산균 검출과 동정 및 결핵균의 리팜핀, 아이나 내성 여부를 동시에 확인하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 검출 및 확인 균주는 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv, 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 스크로폴라시움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 켈로나이(*M. chelonae*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 열서런스 (*M. ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 마이코박테리움 제나벤스(*M. genavense*), 마이코박테리움 시미에 (*M. simmiae*), 마이코박테리움 테라(*M. terrae*), 마이코박테리움 넌크로모제니쿰(*M. nonchromogenicum*), 마이코박테리움 켈라툼(*M. celatum*), 마이코박테리움 고르도나이(*M. gordonae*), 마이코박테리움 줄게일(*M. szulgail*), 마이코박테리움 무코제니쿰(*M. mucogenicum*), 마이코박테리움 오박넨스(*M. aubagnense*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 펠레(*M. phlei*), 마이코박테리움 스메그마티스 (*M. smegmatis*), 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*), 마이코박테리움 페레그리눔 (*M. peregrinum*) 및 마이코박테리움 프라제센스(*M. flavescens*)으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 프라이머는 바이오틴이 표지된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 12의 프라이머 및 서열번호 13 내지 68의 올리고머 프로브가 커플링된 디스크를 포함하는 결핵균 및 비결핵 항산균 검출과 동정 및, 결핵균의 리팜핀, 아이나 내성 여부를 동시에 확인하기 위한 키트를 제공한다.

[0019] 상기 키트는 PCR 증폭 반응을 수행하기 위한 시약으로, DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0020] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0021] 본 발명에서는 국내에서 개발된 QMAP기반 dual-ID를 이용하여 고체 및 액체배양액을 가지고 유용성을 평가해 보았다.
- [0022] 본 발명의 QMAP 기반 Myco-ID는 종특이 다형성이 존재하는 *rpoB* 유전자 부위 (특히 등록번호 10-1377070 (2014.03.12)를 biotin group이 부착된 프라이머로 증폭하고 얻어진 PCR산물을 종특이 프로브가 부착되어있는 microdisk과 반응시켜 결핵균을 포함한 22종 3그룹 (총26종)의 주요 비결핵 항산균(*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* complex, *M. ulcerans*/*M. marinum*, *M. kansasii*, *M. genavense*/*M. simiae*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. mucogenicum*, *M. aubagnense*, *M. malmoense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. peregrinum*/*M. septicum*, *M. flavescens*)을 검출 및 동정이 가능하며, 리팜핀 내성여부를 알 수 있는 분자진단 검사법으로 자동화가 가능하여 96테스트를 진행시 DNA 추출 (30분), PCR 진행 (1시간), TB/NTM 검출 및 동정과 리팜핀, 아이나 내성여부 (1시간 30분) 총 3시간이면 확인이 가능한 부분이 큰 장점이다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 QMAP기반 Myco-ID는 결핵균 및 비결핵 항산균의 구별이 가능하고, 비결핵 항산균의 동정 및 결핵균의 리팜핀, 아이나 내성여부까지 가능하기 때문에 빠른 시간 내에 원인균을 정확히 동정함으로써 비결핵 항산균에 작용할 수 있는 올바른 약제를 처방할 수 있도록 유용한 정보를 제공하며, 본 발명에서 보았듯이 액체배양의 사용이 점차 늘어남에 따라 결핵균과 빨리 자라는 비결핵 항산균과 섞여있는 경우 비결핵 항산균으로 오진되는 것을 방지할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 QMAP기반 Myco-ID는 결핵균 및 비결핵 항산균 감염증의 진단에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 QMAP 시스템에 대한 그림,
 도 2는 REBA Myco-ID의 예에 대한 그림, Lane 1-2, 9, 11, 13 *M. intracellulare*; lane 3, *M. mucogenicum*; lane 4-8, 16-19, *M. tuberculosis*; lane 10, *M. massiliense*; lane 12, *M. avium*; lane 14, *M. fortuitum*; lane 15, *M. abscessus*; lane 20, negative control.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0026] 본 발명의 검체는 2009년 5월부터 9월까지 서울아산병원과 성빈센트 병원에서 결핵균 의심환자로부터 항산균 도말검사와 배양검사가 동시에 의뢰된 고체배양균 (234 검체)와 액체배양액 (297 검체)을 대상으로 하였다.
- [0027] 또한, 결핵균 검출을 위한 항산균 도말 검사와 배양검사는 서울아산병원과 성빈센트 병원에서 수행되었다. 항산균 도말검사는 Carbol-fuchsin을 이용한 Ziehl-Neelsen 염색법을 이용하였고 그 결과는 미국 질병예방통제국의 기준에 따라 판독하였다. 배양검사는 NaOH 처리하여 수거한 균체를 3% Ogawa 배지 (아산제약, 한국)와 BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, Md, USA)에 접종함으로써 검체 내에 포함된 원인균을 배양하였다.
- [0028] 실시예 1. 항산균의 분리 및 동정
- [0029] 직접 검체를 3% Ogawa 배지 와 BACTEC MGIT 960 system에 접종하고 37℃ 에서 배양한 후, 배양액의 일부를 취하여 100℃ 에서 20분간 가열하고 13,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하는 방법을 이용하였다. MTB-ID PCR kit를 이용한 분자진단방법으로 결핵균과 비결핵 항산균을 구분하였다.
- [0030] 실시예 2. REBA Myco-ID의 수행
- [0031] REBA Myco-ID를 수행하기 위해서 검체로부터 분리된 핵산을 biotin이 표지된 primer를 이용하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. Pre-denaturation 과정으로 94℃ 에서 5분간 반응 후, denaturation 과정으로 94℃ 30초와 annealing과 elongation과정으로 65℃에서 30초로 45회 시행하고 최종 72℃에서 7분간 실시하여 270 bp의 PCR 산물을 증폭하였다.

[0032] 증폭한 PCR 산물을 이용한 REBA Myco-ID는 제조자가 제시한 실험조건을 이용하여 시행하였으면 실험방법은 다음과 같다. PCR 산물에 동량의 Denaturation solution (0.2N NaOH, 0.2mM EDTA)을 섞어 실온에 5분간 방치한 후 2X SSPE/0.1% SDS로 희석시켜 준비된 REBA Myco-ID strip (M&D, Korea)에 넣은 후 50℃ 에서 30분간 반응시키고, WS (washing solution)을 이용하여 62℃에서 10분간 두 번 씻어준 후 1:2000 (v/v)으로 희석한 alkaline phosphatase-labeled streptavidin conjugate (Roche, Mannheim, Germany)을 처리하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 strip을 TBS용액 (pH7.5)으로 실온에 1분간 2회 세척하고, alkaline phosphatase에 반응하는 발색용 기질 용액인 NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride and 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, toluidine salt, Roche, Germany)를 pH 9.5인 TBS 용액으로 1:50으로 희석하여 실온에서 strip에 5분간 반응시키면서 프로브에 결합한 PCR 산물을 검출하였다.

[0033] 실시예 3. QMAP 기반 Dual-ID 수행

[0034] QMAP 기반 Myco-ID 를 수행하기 위해서 검체로부터 분리된 핵산을 biotin이 표지된 primer를 이용하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. Pre-denaturation 과정으로 94 ℃ 에서 5분간 반응 후, denaturation 과정으로 94 ℃ 30초와 annealing과 elongation과정으로 65 ℃에서 30초로 45회 시행하고 최종 72 ℃에서 7분간 실시하여 250 bp의 PCR 산물을 증폭하였다.

[0035] 증폭한 PCR 산물에 동량의 Denaturation solution (0.2N NaOH, 0.2mM EDTA)을 섞어 실온에 5분간 방치한 후 hybridization buffer에 희석시켜 준비된 커플링된 disk (Quantamatrix, Seoul, Korea)에 넣은 후 40℃ 에서 30분간 반응시키고, WS (washing solution)을 이용하여 25℃에서 1분간 3회 씻어준 후 1:2000 (v/v)으로 희석한 streptavidin R-phycoerythrin conjugate (Prozyme, San Leandro, CA)을 처리하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 microdisk를 washing buffer로 실온에 1분간 3회 세척하고, 제공되는 QMAP software를 통해 자동으로 disk의 이미지를 측정하여 MTB 또는 NTM 을 검출하고 NTM의 동정, 결핵균의 리팜핀, 아이나 내성여부를 확인할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용된 프라이머 및 프로브(한국 바이오니아에 의뢰하여 합성) 서열은 표 8에 기재하였다.

[0037] 상기 실시예의 결과를 하기에서 서술한다.

[0038] QMAP 기반의 분석적 민감도와 특이도 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR)인 MTB-ID를 이용한 배양 검체 DNA의 결핵균과 비결핵 항산균 감별

[0039] QMAP 기반의 MTB 및 NTM의 분석적 민감도를 알아보기 위해 각 표준 균주 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. mucogenicum*, *M. aubagnense*, *M. malmoense*, *M. phlei*, *M. smgmatis*, *M. xenopi*, *M. peregrinum*, 와 *M. flavescens*)를 이용하여 10배 (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, and 10 fg (1 bacilli) 희석하여 테스트를 진행해봤으며 그 결과 1 pg (100 bacilli)에서 100 fg (10 bacilli)로 검출이 확인 되었다 (표 1). QMAP 기반의 특이도를 확인하기 위하여 총 108균주 (MTB H37Rv, 44 NTM 균주, 및 63 non-mycobacterial 균주)를 가지고 테스트를 진행해봤으며 28 표준 균주는 각 특이 프로브가 커플링된 disk 에 정확하게 검출됨이 확인 되었으며 3가지 프로브는 *M. fortuitum*-*M. marinum*, *M. kansasii*-*M. gastri*, 와 *M. genavense*-*M. avium* 함께 검출되었다 (표 2).

표 1

[0040]

No.	Species	Detection limit	Fluorescence intensity	Copies, Mean copies (SD)	CV (%)
1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	10ng-100fg	5108.7-798.3	2.96 (±1.85) x1000	62.5
2	<i>M. avium</i>	10ng-1pg	2583.3-911	8.01 (±1.6) x1000	20.0
3	<i>M. intracellulare</i>	10ng-1pg	2013-697.5	1.31 (±0.48) x1000	36.3
4	<i>M. scrofulaceum</i>	10ng-1pg	3118.7-696.7	1.82 (±0.89) x1000	48.7
5	<i>M. abscessus</i>	10ng-100fg	3056-774	2.24 (±0.84) x1000	37.4

6	M. chelonae	10ng-100fg	4850.5-703.8	2.96 x1000	(±1.51)	51.1
7	M. fortuitum complex	10ng-100fg	2264-621	1.4 x1000	(±0.59)	41.3
8	M. marinum	10ng-100fg	3602.5-709	2.2 x1000	(±1.1)	50.6
9	M. kansasii	10ng-100fg	4143.5-531	2.12 x1000	(±1.21)	57.2
10	M. genavense	10ng-100fg	3982-654	2.17 x1000	(±1.4)	64.9
11	M. terrae	10ng-100fg	3057-603.3	1.85 x1000	(±0.92)	49.9
12	M. nonchromogenicum	10ng-100fg	2310-861.8	1.5 x1000	(±0.5)	34.3
13	M. celatum	10ng-100fg	3852-625	2.27 x1000	(±1.23)	54.3
14	M. gordonae	10ng-1pg	2157-706	1.56 x1000	(±0.59)	37.6
15	M. szulgai	10ng-1pg	3753.5-763.5	2.31 x1000	(±1.22)	52.8
16	M. mucogenicum	10ng-1pg	4166.3-898	2.8 x1000	(±1.4)	51.5
17	M. aubagnense	10ng-100fg	3683-964.5	2.61 x1000	(±0.98)	37.3
18	M. malmoense	10ng-1pg	3595.5-828.5	2.5 x1000	(±1.06)	42.6
19	M. phlei	10 ng-100 fg	5,009-928	3.1 1000	(±1.7) x	55.2
20	M. smegmatis	10 ng-100 fg	3,897-773	2.3 1000	(±1.2) x	53.1
21	M. xenopi	10ng-100fg	3404.5-814	2.15 x1000	(±0.96)	44.6
22	M. peregrinum	10ng-100fg	3063.7-647.3	2.07 x1000	(±0.86)	41.6
22	M. flavescens	10ng-100fg	3139.5-833.5	2.16 x1000	(±0.89)	41

[0041] 표 1은 QMAP system의 분석적 민감도를 나타낸 표로, 약어: CV, Coefficients of Variation (상관계수)

표 2

Genus	Strain ID	Species	Results of QMAP system regarding M. tuberculosis (Sensitivity/specificity)																	
			M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative	M. tuberculosis positive	M. tuberculosis negative
Mycobacterium strains (75)																				
Mycobacterium	ATCC 25266	M. tuberculosis H37Rv	2500	2500	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19632	M. tuberculosis	1101	1101	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 25496	M. tuberculosis	899	1199	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19581	M. tuberculosis	1242	1242	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19596	M. tuberculosis	1803	1803	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19593	M. tuberculosis	861	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19677	M. tuberculosis	1645	1645	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	Chelon mycobacter	M. tuberculosis	1145	1145	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15466	M. tuberculosis	1767	1767	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19403	M. tuberculosis	1628	1628	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Mycobacterium	ATCC 15719	M. tuberculosis	1172	1172	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19405	M. tuberculosis	1147	1147	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 19405	M. tuberculosis	1005	1005	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15479	M. tuberculosis	1004	1004	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15714	M. tuberculosis	1406	1406	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15713	M. tuberculosis	1401	1401	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15713	M. tuberculosis	1401	1401	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15713	M. tuberculosis	1401	1401	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15713	M. tuberculosis	1401	1401	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	ATCC 15713	M. tuberculosis	1401	1401	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

[0042]

[illegible]

검출된 223 MTB 측정값의 (fluorescence intensity) 범위는 2074에서 4765 (mean 4255.6 \pm SD 458.7)와 11 NTM 측정값은 609에서 3569 (1892 \pm 923.2)으로 각각 나타났다. 또한 297 액체배양액에서 212 MTB 및 77 NTM은 QMAP 테스트에서 각각 양성 시그널이 나타났다. 총 531 균주 중 4균주를 제외한 527 (99.2%)가 정확하게 MTB와 NTM으로 확인되었으며, 검출되지 않은 4균주 중 2균주는 배양음성이었으며, 나머지 2 균주는 sequencing에 의해 각각 *Rhodococcus erythropolis*와 *R. jostii*로 확인되었다. QMAP기반 Myco-ID의 결과를 재확인하기 위하여 또 다른 분자진단방법인 REBA Myco-ID (도 2)를 이용하여 그 결과를 비교한 결과 QMAP 기반의 Myco-ID결과와 모두 일치하는 것을 확인하였다 (표 3).

표 3

AFB smear (n)	Culture (Ogawa), n (%)		Culture (MGIT 960), n (%)		QMAP system, n (%)		Molecutech REBA Myco-ID, n (%)	
	MTB	NTM	MTB	NTM	MTB	NTM	MTB	NTM
Positive (n=340)	223 (95.3)	11 (4.7)	92 (40)	14 (4.7)	315 (59.3)	25 (4.7)	315 (59.3)	25 (4.7)
Negative (n=191)			120 (40.4)	63 (21.2)	120 (22.6)	61 (11.5)	120 (22.6)	61 (11.5)
			Co-infection ^b	6 (2)	Co-infection ^b	6 (1.1)	Co-infection ^b	6 (1.1)
			ND ^c	2 (0.7)	ND ^c	2 (0.4)	ND ^c	2 (0.4)
Total (n=531)	234 (100)		297 (100)		529 (99.6)		529 (99.6)	

표 3은 총 531 배양균 DNA에서 MTB와 NTM 검출을 위한 통상의 방법들, QMAP system과 REBA Myco-ID의 비교 표, 약어: AFB, acid-fast bacilli; MTB, *M. tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacteria; ND, 검출 안됨.

^a NTM의 두 균주는 QMAP system과 REBA Myco-ID에서 검출되지 않았으며, rpoB 서열 분석에 의하여 *Rhodococcus erythropolis* 및 *R. jostii*로 확인됨.

^b NTM 및 NTM로 혼합된 케이스.

^c 도말-배양음성을 가지는 두 케이스.

비결핵 항산균의 검출분포

531 배양균 전체 검체에서 QMAP기반을 통해 94균주가 NTM으로 검출되었으며, NTM의 동정결과를 살펴보면, 전체 94 검체 중 *M. intracellulare*가 36검체(39.1%)로 가장 많이 동정이 되었으며, *M. avium*이 21검체(22.8%), *M. abscessus complex*가 14검체(15.2%), *M. fortuitum*이 7검체(7.6%)의 순으로 분포하고 있었다. 그 외에 *M. gordonae*가 각각 4검체(4.3%)로 나왔으며, *M. kansasii*가 2검체 (2.2%), *M. chelonae*가 1검체 (1.1%)가 나왔으며, *M. avium*과 *M. intracellulare*, *M. avium*과 *M. abscessus*이 각각 섞여있는 경우가 2검체 (2.2%)였으며, *M. avium*과 *M. mucogenicum*, *M. avium*과 *M. mucogenicum* 이 각각 섞여있는 경우가 1검체(1.1%)였다(표 4). 이 결과는 REBA Myco-ID의 결과와 모두 동일하게 나타났으며, 두 종류의 이상의 비결핵 항산균이 섞여 나온 경우까지도 QMAP system에서 모두 정확하게 분리할 수 있음이 확인할 수 있었다.

표 4

MTB/NTM differentiation	Identification of mycobacterial species				
	REBA Myco-ID with culture samples	n (%)	QMAP system with culture samples	n (%)	Ranged fluorescence intensity
NTM (86)	<i>M. intracellulare</i>	36 (39.1)	36 (39.1)	513-2610	932.7 (\pm 381.7)

	M. avium	21 (22.8)	21 (22.8)	517-3569	2065.7 (± 885.9)
	M. abscessus complex	14 (15.2)	14 (15.2)	1338-3543	2534.5 (± 654.9)
	M. fortuitum	7 (7.6)	7 (7.6)	699-1883	1082.1 (± 424.5)
	M. gordonae	4 (4.3)	4 (4.3)	540-1150	776 (± 267.9)
	M. kansasii	2 (2.2)	2 (2.2)	537-949	741.5 (± 289.2)
	M. chelonae	1 (1.1)	1 (1.1)	1640	-
	M. mucogenicum	1 (1.1)	1 (1.1)	2696	-
Co-infection (6)	M. avium and M. intracellulare	2 (2.2)	2 (2.2)	691-2407	1188 (± 836.5)
	M. avium and M. abscessus	2 (2.2)	2 (2.2)	608-3013	2054.8 (± 10003.3)
	M. avium and M. mucogenicum	1 (1.1)	1 (1.1)	625-1625	1125 (± 707.1)
	M. gordonae and M. mucogenicum	1 (1.1)	1 (1.1)	509-2463	1486 (± 1381.7)
Total		92 (100)	92 (100)		

[0058] 표 4는 REBA Myco-ID 및 QMAP system에 의해 분리된 NTM의 분포 비교

[0059] QMAP 기반 리팜핀, 아이나 내성의 유용성 평가

[0060] 총 531 균주 중 결핵균으로 검출된 435 균주에서 Conventional Drug Susceptibility Test (DST) 결과가 있는 고체배양 223 균주를 대상으로 QMAP 기반 리팜핀 내성의 유용성 평가를 진행하였다. 223 결핵 균주 중 리팜핀 내성으로 확인된 균주는 27 (12.1%)이었으며 전통 DST결과와 비교시 모두 일치함을 확인할 수 있었다. 내성으로 확인된 27 균주의 내성 부위는 531TTG가 13균주 (48.1%), △WT4 에서 5 균주 (18.5%), △WT5와 526TAC가 각각 3 (11.1%), 그리고 516GTC, △WT4, △WT2와 △WT4 에서 각각 1 균주 (3.7%)가 내성으로 나타났다. 결과는 리팜핀 내성 확인이 가능한 REBA MTB-MDR을 이용하여 비교하였으며 리팜핀 내성과 내성부위가 모두 일치하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (표 5).

표 5

[0061]

Conventional method (n=223)	Molecular DST	
	REBA MTB-MDR	QMAP system
Rifampin-susceptible (n=196)	196 (87.9%)	196 (87.9%)
Rifampin-resistant (n=27)	27 (12.1%)	27 (12.1%)
531TTG	13 (48.1%)	13 (48.1%)
△S4	5 (18.5%)	5 (18.5%)
526TAC	3 (11.1%)	3 (11.1%)
△S5	3 (11.1%)	3 (11.1%)
516GTC	1 (3.7%)	1 (3.7%)
△S3	1 (3.7%)	1 (3.7%)
△S2, △S4	1 (3.7%)	1 (3.7%)

[0062] 표 5는 총 226 배양균 DNA에서 리팜핀 내성여부 검출을 위한 통상적인 방법, QMAP system과 REBA Myco-ID의 비교

[0063] 아이나 내성으로 확인된 균주는 모두 108균주였으며, 이 중 82 (75.9%)가 katG 315부분에서내성을 나타냈다 (표 6). 결과는 아이나 내성 확인이 가능한 DNA 시퀀싱을 이용하여 비교하였으며 아이나 내성과 내성부위가 모두 일치하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (표 6).

표 6

[0064]

Conventional DST (no.)	QMAP system		DNA Sequencing	
	Type	no. (%)	Sequencing result	no. (%)

INH-susceptible (56)	Wild type	54 (96.4)	Wild type	54 (96.4)
	Mutant type	2 (3.6)	Mutant type	2 (3.6)
	△katG WT	1 (50/0.9)a	katG315 AGC-AAC	1 (50/0.9)
	△oxyR-ahpC WT1	1 (50/0.9)	G-A at position -46	1 (50/0.9)
INH-resistant (144)	Wild type	36 (25)	Wild type	36 (25)
	Mutant type	108 (75)	Mutant type	108 (75)
	katG315 MT	75 (69.4/67.6)	katG315 AGC-ACC	75 (69.4/67.6)
	△katGWT	7 (6.5/6.3)	katG315 AGC-AAC	3 (2.8/2.7)
			katG315 AGC-ACA	2 (1.9/1.8)
			katG315 AGC-AGA	1 (0.9/0.9)
			katG315 AGC-ATC	1 (0.9/0.9)
	inhA 15ups MT	22 (20.4/19.8)	inhA -15C-T	22 (20.4/19.8)
	inhA 8ups MT	1 (0.9/0.9)	inhA -8T-C	1 (0.9/0.9)
	△oxyR-ahpC WT3	2 (1.9/1.8)	C-A at position -11	2 (1.9/1.8)
	katG315 MTinhA 15ups MT	1 (0.9/NE)	katG315 AGC-ACCinhA -15C-T	1 (0.9/NE)

표 6은 배양균 DNA에서 아이나 내성여부 검출을 위한 통상적인 방법, QMAP system과 DNA 시퀀싱의 비교

추가로, Phenotypic DST 결과와 비교하여, QMAP 기반의 리팜핀과 아이나 내성에 대한 민감도는 각각 96.4% (106/110)와 75% (108/144)으로 나타났다. 그러나, DNA 시퀀싱 결과와 비교했을 때, QMAP 기반의 민감도는 리팜핀과 아이나에서 모두 100% (124/124; 95% CI: 0.9743-1.0000)와 100% (110/110, 95% CI: 0.9711-1.0000)를 보였다 (표 7).

표 7

QMAP system	DST results, no.		Sensitivity, % (no.)(95% CI)	Specificity, % (no.)(95% CI)	PPV, % (no.)(95% CI)	NPV, % (no.)(95% CI)
	Resistant	Susceptible				
Rifampicin						
Mutant	106	18	96.4 (106/110)(0.907-0.9888)	80 (72/90)(0.7052-0.8705)	85.5 (106/124)(0.7813-0.9070)	94.7 (72/76)(0.8684-0.9833)
Wild type	4	72				
Isoniazid						
Mutant	108	2	75 (108/144)(0.673-0.8139)	96.4 (54/56)(0.8718-0.9972)	98.2 (108/110)(0.9321-0.9991)	60 (54/90)(0.4966-0.6952)
Wild type	36	54				
	DNA-sequencing results, no.					
	Resistant	Susceptible				
Rifampicin						
Mutant	124	0	100 (124/124)(0.9743-1.0000)	100 (76/76)(0.9587-1.0000)	100 (124/124)(0.97432-1.0000)	100 (76/76)(0.9587-1.0000)
Wild type	0	76				
Isoniazid						
Mutant	110	0	100 (110/110)(0.9711-1.0000)	100 (90/90)(0.9649-1.0000)	100 (110/110)(0.9711-1.0000)	100 (90/90)(0.9649-1.0000)
Wild type	0	90				

DST, drug susceptibility testing; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

표 7은 QMAP system과 DST 결과 및 DNA 시퀀싱 결과의 비교

표 8

[0070]

Name	Primer sequence (5'-3')	
360long-F	TCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGC (서열번호 1)	Myco-ID
250R*	ACS CGG ATC TGG TTC TGG ATC ARC (서열번호 2)	5'-Biotin
I417-F	CTTGGTGGTGGGGTGTGGTGTGTA (서열번호 3)	Myco-ID
I638R*	GCCAAGGCATYCACCATGYGCCCTTA (서열번호 4)	5'-Biotin
TR9	TCGCCGCGATCAAGGAGTTCT (서열번호 5)	Rifampin
TR8*	TGCACGTCGCGGACCTCCA (서열번호 6)	5'-Biotin
katG-F	AGCTCGTATGGCACCGGAAC (서열번호 7)	Isoniazid
katG-R*	CCGTACAGGATCTCGAGGAA (서열번호 8)	5'-Biotin
inhA-F	GCTCGTGGACATACCGATT (서열번호 9)	Isoniazid
inhA-R*	ACTGAACGGGATACGAATGG (서열번호 10)	5'-Biotin
ahpC-F	CCGGCTAGCACCTCTTGGCG (서열번호 11)	Isoniazid
ahpC-R*	ATTGATCGCCAATGGTTAGC (서열번호 12)	5'-Biotin
Name	Myco-Probe sequence (5'-3')	
Myc-14	TTT TTT TTT TTT TTT ACCGARGARGACGTGCTGCCACCATCGA (서열번호 13)	Mycobacterium spp.
TB-13	TTT TTT TTT TTT TTT G CAT GTC GGC GAG CCC atc acgT (서열번호 14)	MTB complex
IMTB	TTT TTT TTT TTT TTT GAGCATCAATGGATACGCTGCCGGCTAGC (서열번호 15)	MTB complex
Avi-1	TTT TTT TTT TTT TTT CAC GCCGGTGAGCCGATACCA (서열번호 16)	M. avium
Iavi-1	TTT TTT TTT TTT TTT GCGAGCATCTAGATGAACGCGTGGTCTTCATG (서열번호 17)	M. avium
Int-1	TTT TTT TTT TTT TTT CTC CGGCCTGCACGGGGCGAG (서열번호 18)	M. intracellulare
Iint-2	TTT TTT TTT TTT TTT TAGATGAGCGCATAGTCCTTAGGGCTGATGC (서열번호 19)	M. intracellulare
SC-long-3	TTT TTT TTT TTT TTT CAC GCCCGTACGGATGGCCAGC (서열번호 20)	M. scrofulaceum
Ab-4	TTT TTT TTT TTT TTT GC ACC AAT CCG GCTC AGG TG A CCA CCA CC (서열번호 21)	M. abscessus
Iabs	TTT TTT TTT TTT TTT CA TAGCCTCGCTCGTTTCGAGTGGGGCTG (서열번호 22)	M. abscessus
3a-CH-1	TTT TTT TTT TTT TTT TGCCAACCCGGCTCTGGTGACTG (서열번호 23)	M. chelonae
Iche	TTT TTT TTT TTT TTT TAACAAGCCTCGCTCGTTACGAGTGAGGTTA (서열번호 24)	M. chelonae
Forts-1	TTT TTT TTT TTT TTT GGG CCTGAACGCCGCCAG (서열번호 25)	M. fortuitum
Ifort-1	TTT TTT TTT TTT TTT AGTGTGGCTGGGGGCCCTTCGGGTTTC (서열번호 26)	M. fortuitum
4a-U/M-L	TTT TTT TTT TTT TTT AGGCCAGCCATCACCAGC (서열번호 27)	M. ulcerans/M. marinum
Imari-6	TTT TTT TTT TTT TTT AAA TT GGATGCGCTGCCTTT (서열번호 28)	M. ulcerans/M. marinum
Ikan-1	TTT TTT TTT TTT TTT ATCAAATGGATGCGTTGCCTACGGGTA (서열번호 29)	M. kansasii
kanII-L1-2	TTT TTT TTT TTT TTT GGCCTCAACACCAAGGACCCGATCACCACG (서열번호 30)	M. kansasii
Igen/sim-1	TTT TTT TTT TTT TTT ATCTAAATGAACGCGTCGCCGGAAC GGTTA (서열번호 31)	M. genavense/M. simmiae
TE2-3	TTT TTT TTT TTT TTT CCGGCCGACCCGCGACGTCGAGACGT (서열번호 32)	M. terrae
3a-Non-L-1	TTT TTT TTT TTT TTT ACCG CCA ACC CGG G TGAGGCGCA (서열번호 33)	M. nonchromogenicum
Cel-I	TTT TTT TTT TTT TTT CGAGAGCCCAATCACCACC (서열번호 34)	M. celatum
Cel-II	TTT TTT TTT TTT TTT CGCGTCCCCGATCAGAC (서열번호 35)	M. celatum
Igo-2	TTT TTT TTT TTT TTT CGAGCATCAAAATGTATGCGTTGTCTCTC (서열번호 36)	M. gordonae
Szul-4	TTT TTT TTT TTT TTT GAACGTCGGCGAGCCGATCACCAGTT (서열번호 37)	M. szulgai
Iszul-4	TTT TTT TTT TTT TTT AAA GGATGCGCTGCCCTCG (서열번호 38)	M. szulgai
Muco-16	TTT TTT TTT TTT TTT CACG ACG GCAACCCGGCTCAGGTGACCGCG (서열번호 39)	M. mucogenicum
Auba-3	TTT TTT TTT TTT TTT GCGAACTCCGACGGCAGCAGCCGCT (서열번호 40)	M. aubagnense
mal	TTT TTT TTT TTT TTT CGA GTCGGCCGTACCCGCCTCGACCAC (서열번호 41)	M. malmoense
Iphlei	TTT TTT TTT TTT TTT CCTTT TTTGGGGGTTCTTGGGTGTTTCG (서열번호 42)	M. phlei
Ismeg	TTT TTT TTT TTT TTT TAAGAGTGTGGCTGCCGCCTTTGAGGT (서열번호 43)	M. smegmatis
Ixeno	TTT TTT TTT TTT TTT TGCGAGCATCTGGCAAAGACTGTGTAAGCGG (서열번호 44)	M. xenopi
Iflav	TTT TTT TTT TTT TTT GAACAGGTGGCTCCCTTTTGGGGGTTGCTT (서열번호 45)	M. flavescens
Ipere	TTT TTT TTT TTT TTT AAAATGTGTGGTCTCACTCCTTGTGGGTG (서열번호 46)	M. peregrinum / M. septicum
Name	Rifampin probe sequence (5'-3')	position

S1	TTT TTT TTT TTT TTT AGCCAGCTGAGCCAATTC(서열번호 47)	509-514
S2	TTT TTT TTT TTT TTT CATGGACCAGAACAACCCGC(서열번호 48)	514-520
S3	TTT TTT TTT TTT TTT CCGCTGTCGGGGTTGACC(서열번호 49)	520-525
S4	TTT TTT TTT TTT TTT G TTG ACC CAC AAG CGC CGA(서열번호 50)	524-529
S5-1	TTT TTT TTT TTT TTT AAA CTGTCGGCGCTGGGGC(서열번호 51)	530-534
S5-3	TTT TTT TTT TTT TTT ACTGTCGGCGCTGGGGC(서열번호 52)	530-534
531TTG-3	TTT TTT TTT TTT TTT AAG CGC C GA CTG TTG GC G CTGGGGCC(서열번호 53)	
526TAC-3	TTT TTT TTT TTT TTT A G G TTG ACC TAC AAG CGCCGA(서열번호 54)	
516GTC-2	TTT TTT TTT TTT TTT TTC ATG GTC CAG AAC AAC CC G (서열번호 55)	
516TAC-2	TTT TTT TTT TTT TTT CAA TTC ATG TAC CAG AAC AAC CC (서열번호 56)	
513CCA	TTT TTT TTT TTT TTT G CTG AGC CCA TTC ATG GAC (서열번호 57)	
Name	Isoniazid probe sequence (5'-3')	position
katG-WT	TTT TTT TTT TTT TTT AAATCACCAGCGGCATCGAG (서열번호 58)	katG 315 WT-1
katG-MT	TTT TTT TTT TTT TTT AAATCACCAGCGGCATCGAAG (서열번호 59)	katG-315MT-3
inhA-15WT	TTTTTTTTTTTTTTT AAA GCCGCGGCGAGACGATAGGTT (서열번호 60)	inhA-15WT2-3
inhA-15MT	TTTTTTTTTTTTTTT AAAGCGGCGAGATGATAGGTTGT (서열번호 61)	inhA-15MT-6
inhA-8WT	TTTTTTTTTTTTTTT GACGATAGGTTGTCGGGGTGA (서열번호 62)	inhA-8WT-1
inhA-8MT	TTT TTT TTT TTT TTT GACGATAGGCTGTCGGG (서열번호 63)	inhA-8MT-1
ahpC-WT1	TTT TTT TTT TTT TTT ATATGGTGTGATATACCTTTGC (서열번호 64)	ahpC-WT1-4
ahpC-WT2	TTT TTT TTT TTT TTT AAACCTTTGCTGACAGCGACTT (서열번호 65)	ahpC-WT2-2
ahpC-WT3	TTT TTT TTT TTT TTT TTCACGGCAGCATGGAATGT (서열번호 66)	ahpC-WT3-6
ahpC-WT4	TTT TTT TTT TTT TTT CGCAACCAAATGCATTGTC (서열번호 67)	ahpC-WT4-3
ahpC-WT5	TTT TTT TTT TTT TTT TTTGATGATGAGGAGAGTCATGC (서열번호 68)	ahpC-WT5-5

[0071] 표 8은 본 발명에 사용된 프라이머 및 프로브 서열

[0072] 본 발명의 방법과 기존 REBA 비교

[0073] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, REBA Myco-ID의 경우 검출가능한 종은 결핵균을 포함하여 모두 19종이다. 이에 반하여 본 발명의 QMAP 기반의 진단법은 REBA Myco-ID보다 7개의 균종이 더 포함되어 있어 더 많은 균종을 분리할 수 있다. 즉, 본 발명의 QMAP system의 경우 결핵균을 포함한 26종의 주요 비결핵 항산균(*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* complex, *M. ulcerans*/*M. marinum*, *M. kansasii*, *M. genavense*/*M. simiae*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. mucogenicum*, *M. aubagnense*, 이외에 추가로 *M. malmoense*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. flavescens*이 추가로 분리될 수 있다.

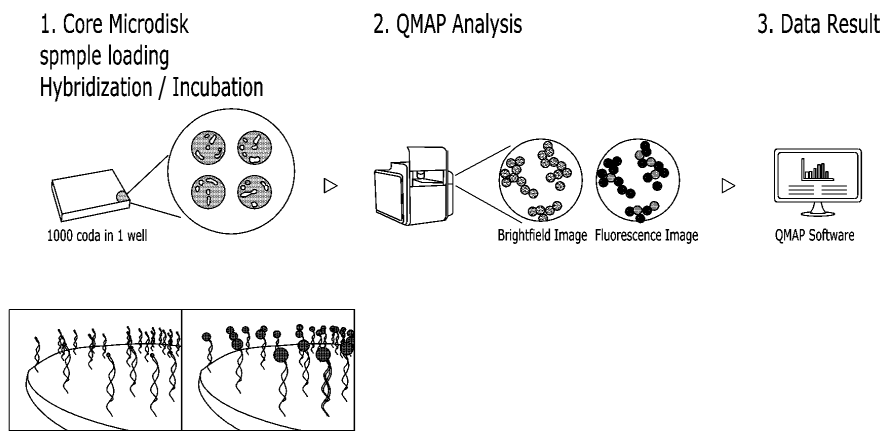
[0074] 또한 REBA Myco-ID보다 우수한 점은 REBA Myco-ID경우 결핵과 NTM만을 구별할 수 있으나 QMAP 기반의 진단법은 결핵일 경우 결핵의 1차 약제로 사용되는 가장 중요한 리팜핀의 내성여부까지 확인이 가능하여 빠르게 내성여부를 판단하고 치료제의 선별에 도움을 줄 수 있다.

[0075] 상기 표 5-7처럼 QMAP기반의 분자법은 결핵이 나온 경우 리팜핀, 아이나 감성-내성 유무, 내성일 경우 어느위치에서 내성을 보였는지 확인이 가능하다. QMAP기반의 분자법, 이번 출원을 목적으로 하는 검사법의 경우 전통적인 내성방법과 비교하였을때의 결과도 우수한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. REBA Myco-ID의 경우 결핵/NTM의 동정만 가능하기 때문에 결핵일 경우 리팜핀 내성을 확인하기 위해서는 REBA MTB-MDR과 같은 다른 분자진단법을 이용하여 추가 테스트를 진행해야 하나, 본 발명의 방법은 이러한 추가 테스트가 필요하지 아니하다.

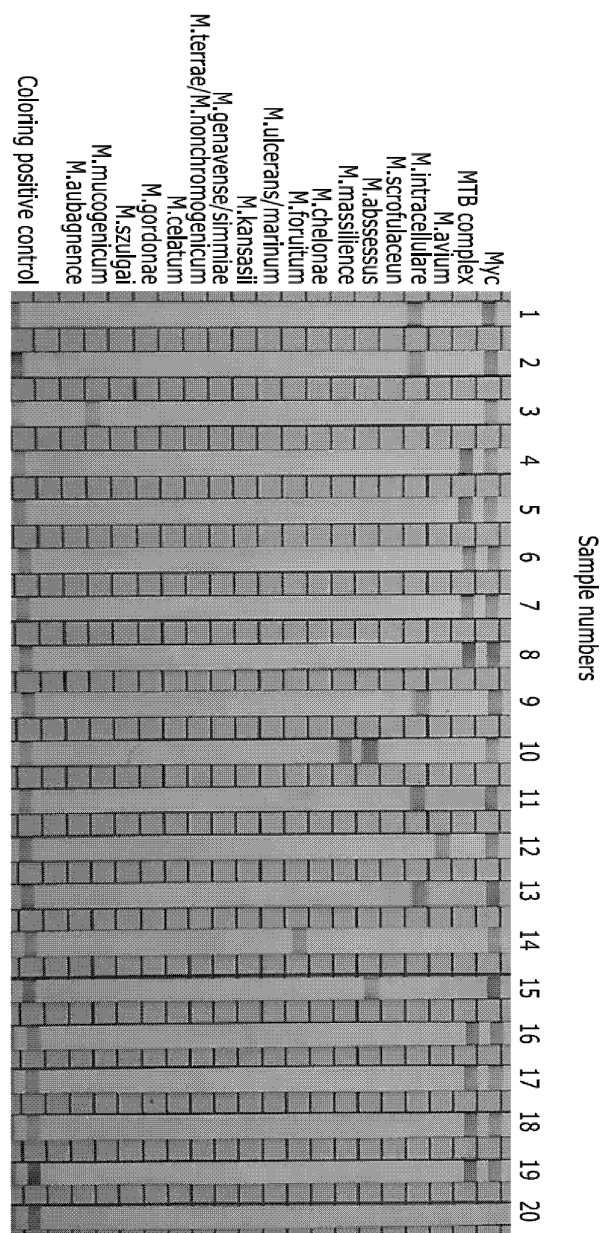
[0076] 또한, 본 발명의 QMAP 기반의 진단법의 또 한가지의 장점은 검출 시간의 단축이다. 통상 96 테스트를 진행하기 위해서 REBA Myco-ID의 경우 5시간 이상이 소요 (REBA진행시간만)가 되나 QMAP의 경우는 1시간 40분의 검출시간을 단축시킬 수 있어서 진단에서 가장 중요한 시간을 단축시킬 수 있는 효과가 있다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Optipharm.CO.,LTD
 UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS
- <120> A method for simultaneously detecting and identifying
 Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacteria and
 rifampicin-resistance of Mycobacterium tuberculosis, and a kit
 therefor based QuantaMatrix assay Platform
- <130> OP17-0031HSPCT
- <150> KR 10-2016-0099515
- <151> 2016-08-04

<160> 68
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 25

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 tcaaggagaa gcgctacgac ctggc 25
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 acscggatct ggttctggat carc 24
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 cttggtggtg ggggtgtggtg tttga 25

 <210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gccaaaggcat ycaccatgyg ccctta 26
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tcgccgcgat caaggagttc t 21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tgcacgtcgc ggacctcca 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

agctcgtatg gcaccggaac 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ccgtacagga tctcgaggaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gctcgtggac ataccgattt 20

<210> 10

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 actgaacggg atacgaatg 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 ccggctagca cctcttggcg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 attgatcgcc aatggtagc 20

 <210> 13
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 13
 ttttttttt tttttaccga rgargacgtc gtcgccacca tcga 44
 <210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 14
 ttttttttt tttttgcatg tcggcgagcc catcacgt 38

<210> 15
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 15
 tttttttttt tttttgagca tcaatggata cgctgccggc tagc 44

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 16
 tttttttttt tttttcacgc cggtgagccg atcacca 37

<210> 17
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 17
 tttttttttt tttttgagc catctagatg aacgcgtggt cttcatg 47

<210> 18
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 18
 tttttttttt tttttctccg gcctgcacgc gggcgag 37

<210> 19
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe

<400> 19
 tttttttttt ttttttagat gagcgcatag tccttagggc tgatgc 46

<210> 20
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 20
 tttttttttt tttttcacgc ccgtacggat ggccagc 37

<210> 21
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 21
 tttttttttt tttttgcacc aatccggctc aggtgaccac cacc 44

<210> 22
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 22
 tttttttttt tttttcatag cctcgctcgt ttctgagtgg ggctg 45

<210> 23
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 23
 tttttttttt ttttttgcca acccggtctt ggtgactg 38

<210> 24
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> probe
 <400> 24
 tttttttttt tttttaaca agcctcgctc gtttacgagt gaggtta 47

<210> 25
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 25
 tttttttttt tttttgggcc tgaacgccgg ccag 34

<210> 26
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 26
 tttttttttt tttttagtgt ggctgggggc cttcgggttt c 41

<210> 27
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 27
 tttttttttt tttttaggcc agcccatcac cagc 34

<210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 28
 tttttttttt tttttaaat ggatgcgctg ccttt 35

<210> 29
 <211> 43

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 29
 tttttttttt tttttatcaa atggatgcgt tgcctacgg gta 43
 <210> 30
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 30
 tttttttttt tttttggcct caacaccaag gaccgatca ccacg 45

 <210> 31
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 31
 tttttttttt tttttatcta aatgaacgcg tcgccggcaa cggtta 46
 <210> 32
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 32
 tttttttttt tttttccggc cgcacccgcc gacgtcgaga cgt 43
 <210> 33
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 33
 tttttttttt tttttaccgc caaccgggt gaggcgca 38

<210> 34
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 34
 tttttttttt tttttcgaga gcccaatcac cacc 34
 <210> 35
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 35
 tttttttttt tttttcgagt ccccgatcac gac 33
 <210> 36
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 36
 tttttttttt tttttcgagc atcaaaatgt atgcgttgtc gttctc 46
 <210> 37
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 37
 tttttttttt tttttgaacg tcggcgagcc gatcaccagt t 41
 <210> 38
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 38

tttttttttt tttttaagg atgcgctgcc ctcg	34
<210> 39	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 39	
tttttttttt tttttcacga cggcaaccg gctcaggtga ccgcg	45
<210> 40	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 40	
tttttttttt tttttgcgaa ctccgacggc acgcagccgc t	41
<210> 41	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 41	
tttttttttt tttttcgagt cggccgtacc cgcctcgacc ac	42
<210> 42	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> probe	
<400> 42	
tttttttttt tttttccttt ttttgggggt tcttgggtgt tcg	43
<210> 43	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> probe

<400> 43

tttttttttt tttttaaga gtgtggctgc cggcctttga ggt 43

<210> 44

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 44

tttttttttt ttttttgcga gcatctggca aagactgtgg taagcgg 47

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 45

tttttttttt tttttgaaca ggtggctccc ttttgggggt tgctt 45

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 46

tttttttttt tttttaaat gtgtggtctc actccttggt ggtg 44

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 47

tttttttttt tttttagcca gctgagccaa ttc 33

<210> 48

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 48
 tttttttttt tttttcatgg accagaacaa cccgc 35

<210> 49
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 49
 tttttttttt tttttccgct gtcggggttg acc 33

<210> 50
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 50
 tttttttttt tttttgttga cccacaagcg ccga 34

<210> 51
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 51
 tttttttttt tttttaact gtcggcgctg gggc 34

<210> 52
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 52
 tttttttttt tttttactgt cggcgctggg gc 32

<210> 53

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 53
 tttttttttt tttttaagcg ccgactgttg gcgctggggc c 41
 <210> 54
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 54
 tttttttttt tttttagggtt gacctacaag cgccga 36
 <210> 55
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 55
 tttttttttt tttttttcat ggtccagaac aaccgc 36
 <210> 56
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 56
 tttttttttt tttttcaatt catgtaccag aacaaccc 38
 <210> 57
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 57

tttttttttt tttttgctga gcccatcat ggac 34

<210> 58

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 58

tttttttttt tttttaaatc accagcggca tcgag 35

<210> 59

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 59

tttttttttt tttttaaatc accacggca tcgaag 36

<210> 60

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 60

tttttttttt tttttaaacg cgcggcgaga cgataggtt 39

<210> 61

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 61

tttttttttt tttttaaacg ggcgagatga taggttgt 38

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe
 <400> 62
 tttttttttt tttttgacga taggttgctg ggggtga 36
 <210> 63
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 63
 tttttttttt tttttgacga taggctgtcg gg 32

 <210> 64
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 64
 tttttttttt tttttatatg gtgtgatata tcacctttgc 40
 <210> 65
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 65
 tttttttttt tttttaaaccc tttgcctgac agcgactt 38
 <210> 66
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 66
 tttttttttt tttttttcac ggcacgatgg aatgt 35

 <210> 67
 <211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 67

tttttttttt tttttcgcaa ccaaatgcat tgtc 34

<210> 68

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 68

tttttttttt ttttttttga tgatgaggag agtcatgc 38