



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0023449
(43) 공개일자 2022년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0105176
(22) 출원일자 2020년08월21일
심사청구일자 2020년08월21일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
홍지영
강원도 춘천시 동내면 외솔길19번길 80-7
김영미
강원도 춘천시 국사봉길 7, 104동 301호 (퇴계 우성아파트)
이재준
강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증의학과
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 14 항

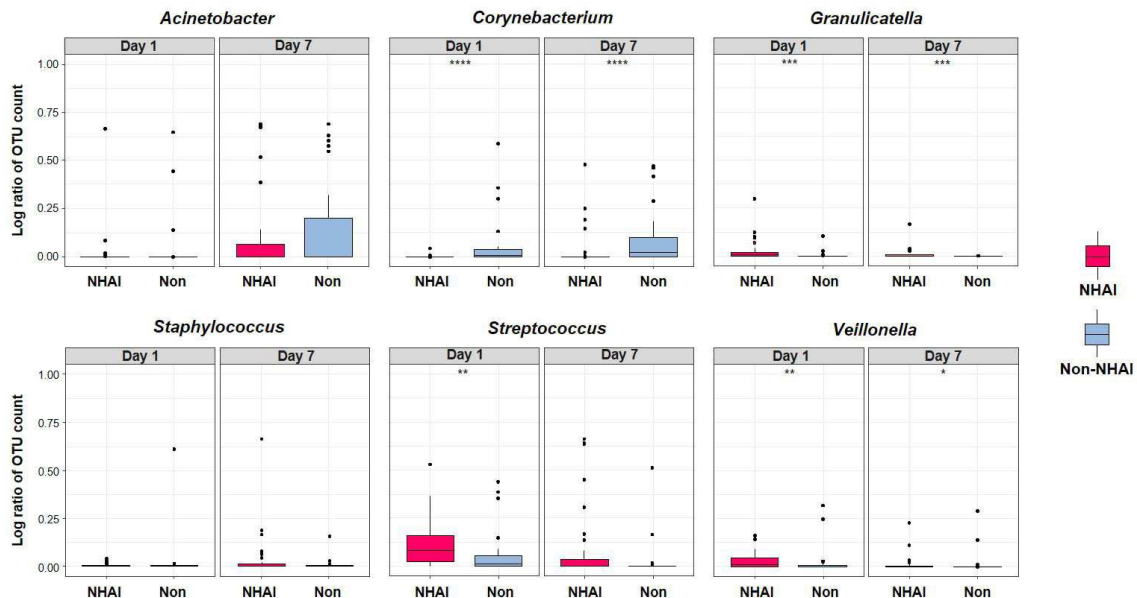
(54) 발명의 명칭 기계적 인공호흡 환자의 호흡기 미생물 프로파일링 방법

(57) 요약

헬스케어 관련 폐렴 (health care-associated pneumonia; HCAP)은 이종 질병이다. 이전 연구에 따르면 HCAP의 위험 인자를 식별하면 약물 내성 병원체를 좀 더 정확하게 예측할 수 있다. 기존 HCAP 위험 요소를 수정하여 새로운 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing-home- and hospital-associated infections; NHA)을 조사했다. NHA

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



균은 기능 상태가 좋지 않거나 최근 (지난 90일 내) 입원 또는 최근 (지난 180일 내) 항생제 치료를 받은 요양원 거주자로 구성되었다. 기관 내 흡인물은 대학병원의 중환자실 (ICU) 환자들로부터 전향적으로 수집되었다.

미생물 분석은 비 NHAI 군에서보다 NHAI 군에서 α - 다양성이 현저히 낮음을 보여주었다. β - 다양성의 분석에서, 미생물 구조 또한 두 군 사이에서 유의미하게 달랐다 (가중 UniFrac 거리, Adonis, $P < 0.001$). 코리네박테리움의 풍부도는 유의하게 높았고, 그레놀리카텔라, 스타필로코커스, 스트렙토코커스 및 베일로넬라의 상대적 풍부도는 비 NHAI 군보다 NHAI 군에서 유의하게 낮았다.

기관 내 튜브 흡인물의 미생물은 NHAI에 대한 위험 인자가 있거나 없는 환자들 사이에서 구별되었다. 따라서, 폐 마이크로바이옴은 요양원 및 병원 환경에 노출된 삽관 환자에 대한 바이오 마커 및 치료 표적으로서 작용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105185
과제번호	2017M3A9E8033225
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	임상의과학자연구역량강화사업
연구과제명	인공 호흡기 관련 폐렴에 영향을 미치는 마이크로바이옴 요인 발굴 및 타겟 치료 연

구

기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2017.04.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113414
과제번호	2020R1A2C1011455
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	결핵후 섬유화로 인해 변형된 중양미세환경에서 NOX4 매개 기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;

수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;

증폭된 서열을 분석하는 단계;

서열 분석 결과 얻어진 관독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계; 및

분류학적 할당 결과, 그레놀리카텔라 (*Granulicatella*) 속, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 스타필로코커스 (*Staphylococcus*) 속 및 베일로넬라 (*Veillonella*) 속 중 1종 이상의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 낮은 경우 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 2

기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;

수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;

증폭된 서열을 분석하는 단계;

서열 분석 결과 얻어진 관독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계; 및

분류학적 할당 결과, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 높은 경우 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 호흡기 시료는 기관 내 흡인으로 얻은 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 호흡기 시료는 기계적 인공호흡 개시로부터 1일 내지 7일 중 하나 이상의 날짜에 수집한 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 분류학적 할당은 16S 미생물 데이터베이스를 참조하여 BLASTN (2.4.0)을 사용하여 가장 유사한 종에 대한

정보를 얻는, 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 프라이머는 원핵생물 16S rRNA 유전자의 V3 또는 V4 영역 중 하나 이상의 영역을 표적으로 하는 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 7

청구항 2에 있어서,

상기 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속은 코리네박테리움 얼서란스 (*Corynebacterium ulcerans*)인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법.

청구항 8

코리네박테리움 속을 검출하기 위한 프라이머-프로브 세트를 포함하며, 기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 가하여 코리네박테리움 속의 존재를 판별하는 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI) 위험 인자 탐지용 PCR 키트.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 코리네박테리움 속은 코리네박테리움 얼서란스인, 영양원 및 병원 관련 감염 위험 인자 탐지용 PCR 키트.

청구항 10

코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속을 검출하기 위한 프라이머-프로브 세트를 포함하는 영양원 및 병원 관련 감염 위험 인자 탐지용 PCR 칩.

청구항 11

기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;

수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;

증폭된 서열을 분석하는 단계;

서열 분석 결과 얻어진 관독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계;

분류학적 할당 결과, 그라눌리카텔라 (*Granulicatella*) 속, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 속 및 베일로넬라 (*Veillonella*) 속 중 1종 이상의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 낮은 경우 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계; 및

영양원 및 병원 관련 감염인 것으로 판정된 경우, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제를 투여하는 단계;를 포함하는 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법.

청구항 12

기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;

수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;

추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;

증폭된 서열을 분석하는 단계;

서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계;

분류학적 할당 결과, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 높은 경우
요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계;
및

요양원 및 병원 관련 감염인 것으로 판정된 경우, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제를
투여하는 단계;를 포함하는 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 코리네박테리움 속은 코리네박테리움 얼서란스인, 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법.

청구항 14

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서,

상기 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제는 β -락탐, 아미노글라이코사이드
(aminoglycosides) 및 글라이코펩타이드제 (glycopeptides agents) 중 1종 이상인, 기계적 인공호흡 환자를 치
료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 기계적 인공호흡 환자의 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것으로서, 헬스케어 관련 폐렴에서
호흡기 미생물군의 구성이 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection;
NHAI) 위험 인자에 따라 달라지므로, 기계적 인공호흡 환자의 호흡기 미생물군을 프로파일링하여 NHAI 위험 인
자의 유무를 확인함으로써 적합한 항생제를 처방할 수 있도록 하여 기계적 인공호흡 폐렴 환자의 효과적인 치료
를 가능하게 할 수 있다.

배경 기술

[0003]

2016년 및 2019년 ATS/IDSA 지침은 헬스케어 관련 폐렴 (HCAP) 카테고리틀 포기할 것을 권장한다 (1, 2). 이것
은 넓은 범위의 항생제 치료법이 병원성 폐렴뿐만 아니라 헬스케어 관련 폐렴 (HCAP)에서도 고려되어야 한다고
주장하는 이전의 2005 지침과는 대조적이다 (3). 이러한 변화는 동반질병 또는 연령을 포함한 환자의 기본 특성
이 다제 내성 (multidrug resistant; MDR) 병원체에 대한 위험을 결정하는 요인이지만 헬스케어 관련 폐렴
(HCAP) 기준은 그렇지 않음을 보여주는 여러 연구를 기반으로 한다 (4-6). Jones 등은 HCAP 기준의 수용으로 넓
은 항생제 사용에 대한 임계값이 줄어들고 병원 내 병원체와 매치되는 항생제 적용 범위가 낮음을 보여주었다
(7). 그러나, 요양원 입원 또는 이전 90일 내의 최근 입원과 같은 일부 HCAP 기준은 MDR 감염의 독립적 예측 변

수이다 (5, 8, 9). 예컨대, 기계적 인공호흡이 필요한 HCAP 환자의 MDR 감염 위험은 병원 감염과 유사하게 높다 (10, 11).

[0004]

종래 연구를 바탕으로, 이전 HCAP 기준보다 병원 내 병원체를 더 잘 예측하기 위해 최근 입원 여부, 영양원 거주 여부 및 지난 90일간의 항생제 사용 여부와 같은 세 가지 위험 인자가 제안되었다 (5, 8, 12). 16S rRNA와 같이 미생물 군집의 특성을 규명하는 새로운 배양-비의존적 방법은 환자 위험군의 특성을 좀 더 잘 규명하고 적절한 치료 전략을 이끌어낼 수 있다 (13). 우리는 기계 환기 중 호흡기 미생물군의 구성이 새로 정의된 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI) 위험 인자에 따라 달라진다는 가설을 세운 후 삽관 환자의 기관 내 튜브 흡인물 (endotracheal tube aspirates; ETA)을 프로파일링하고 ETA 미생물군과 NHAI 위험 인자 사이의 관계를 결정하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

(비특허문헌 0001) Kalil AC et al., Clin Infect Dis. 2016;63(5):e61-e111.

(비특허문헌 0002) Metlay JP et al., Am J Respir Crit Care Med. 2019;200(7):e45-e67.

(비특허문헌 0003) American Thoracic S, Infectious Diseases Society of A. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(4):388-416.

(비특허문헌 0004) Chalmers JD et al., Clin Infect Dis. 2014;58(3):330-9.

(비특허문헌 0005) Gross AE et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5262-8.

(비특허문헌 0006) Yap V et al., Infect Dis Clin N Am. 2013;27(1):1-+.

(비특허문헌 0007) Jones BE et al., Clin Infect Dis. 2015;61(9):1403-10.

(비특허문헌 0008) Park SC et al., Respir Med. 2012;106(9):1311-9.

(비특허문헌 0009) Schreiber MP et al., Chest. 2010;137(6):1283-8.

(비특허문헌 0010) El-Solh AA et al., Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(3 Pt 1):645-51.

(비특허문헌 0011) El Solh AA et al., Clin Infect Dis. 2004;39(4):474-80.

(비특허문헌 0012) Shorr AF et al., Arch Intern Med. 2008;168(20):2205-10.

(비특허문헌 0013) Xia LP et al., Int J Clin Exp Med. 2015;8(10):18560-70.

(비특허문헌 0014) Brito V et al., Curr Opin Infect Dis. 2009;22(3):316-25.

(비특허문헌 0015) Umeki K et al., Respirology. 2011;16(5):856-61.

(비특허문헌 0016) Charlson ME et al., J Chronic Dis. 1987;40(5):373-83.

(비특허문헌 0017) Schmieder R et al., Bioinformatics. 2011;27(6):863-864.

(비특허문헌 0018) Martin M. EMBry.journal. 2011;17(1).

(비특허문헌 0019) Zhang J et al., Bioinformatics. 2014;30(5):614-620.

(비특허문헌 0020) Edgar RC. Bioinformatics. 2010;26(19):2460-2461.

(비특허문헌 0021) Caporaso JG et al., Nat Methods. 2010;7(5):335-336.

(비특허문헌 0022) Yoon SH et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67(5):1613-1617.

(비특허문헌 0023) Plantinga AM et al., Bioinformatics. 2019;35(19):3567-75.

(비특허문헌 0024) Kim KJ et al., Bioinformatics. 2020;36(4):1000-6.

- (비특허문헌 0025) Morton JT et al., Nat Commun. 2019;10(1):2719.
- (비특허문헌 0026) Kollef MH et al., Chest. 2005;128(6):3854-62.
- (비특허문헌 0027) Micek ST et al., Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(10):3568-73.
- (비특허문헌 0028) Shindo Y et al., Chest. 2009;135(3):633-40.
- (비특허문헌 0029) Chalmers JD et al., Clin Infect Dis. 2011;53(2):107-13.
- (비특허문헌 0030) Park HK et al., Respir Med. 2010;104(11):1729-35.
- (비특허문헌 0031) Kelly BJ et al., Microbiome. 2016;4:7.
- (비특허문헌 0032) Lipsky BA et al., Rev Infect Dis. 1982;4(6):1220-35.
- (비특허문헌 0033) Clariot S et al., Infection. 2020.
- (비특허문헌 0034) Yatera K et al., Respir Investig. 2020.
- (비특허문헌 0035) Yang K et al., Pneumonia (Nathan). 2018;10:10.
- (비특허문헌 0036) Yasuda I et al., Emerg Infect Dis. 2018;24(3):588-91.
- (비특허문헌 0037) Yatera K et al., Tohoku J Exp Med. 2017;242(1):9-17.
- (비특허문헌 0038) de Steenhuijsen Piters WA et al., ISME J. 2016;10(1):97-108.
- (비특허문헌 0039) Zakharkina T et al., Thorax. 2017;72(9):803-10.
- (비특허문헌 0040) Bousbia S et al., PLoS One. 2012;7(2):e32486.
- (비특허문헌 0041) Segal LN et al., Nat Microbiol. 2016;1:16031.
- (비특허문헌 0042) Kitsios GD et al., Front Microbiol. 2018;9:1413.
- (비특허문헌 0043) Carratala J et al., Arch Intern Med. 2007;167(13):1393-9.
- (비특허문헌 0044) Dickson RP et al., Am J Respir Crit Care Med. 2020;201(5):555-63.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 헬스케어 관련 폐렴 환자 중 기계적 인공호흡 중인 중환자실 환자에게 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI) 위험 인자가 있는지를 확인하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 헬스케어 관련 폐렴 (health care-associated pneumonia; HCAP)은 이종 질병이다. 이전 연구에 따르면 HCAP의 위험 인자를 식별하면 약물 내성 병원체를 좀 더 정확하게 예측할 수 있다. 기존 HCAP 위험 요소를 수정하여 새로운 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing-home- and hospital-associated infections; NHAI)을 조사했다. 본 발명에서 우리의 목표는 호흡기 미생물 프로파일이 기계적 환기 중인 치명적인 환자에서 NHAI에 대한 새로 정의된 위험 요소와 관련되는지 여부를 결정하는 것이다.
- [0010] NHAI 군은 기능 상태가 좋지 않거나 최근 (지난 90일 내) 입원 또는 최근 (지난 180일 내) 항생제 치료를 받은 요양원 거주자로 구성되었다. 기관 내 흡인물은 대학병원의 중환자실 (ICU) 환자들로부터 전향적으로 수집되었다. 60명의 기계적 환기 중인 중환자실 환자 (NHAI 군, n = 24; 비 NHAI 군, n = 36)로부터 180개의 기관 내 흡인물을 1, 3 및 7일에 각각 수득하였다. 기관 내 튜브 흡인물 (ETA)의 박테리아 군집 프로파일은 16S rRNA 유전자 서열분석에 의해 탐구하였다. 계통 발생수-기반 미생물과 질병 연관성 테스트 (tree-based microbiome

association test; TMAT), 일반화 선형 혼합 모델 (GLMM), 윌콕슨 (Wilcoxon) 테스트 및 참조 프레임 방법을 사용하여 미생물 풍부도 (작동 분류학 단위 수 (OTU))와 질병 표현형 사이의 연관성을 분석하였다.

- [0011] 미생물 분석은 비 NHA이 군에서보다 NHA이 군에서 α - 다양성이 현저히 낮음을 보여주었다. β - 다양성의 분석에서, 미생물 구조 또한 두 군 사이에서 유의미하게 달랐다 (가중 UniFrac 거리, Adonis, $P < 0.001$). 코리네박테리움의 풍부도는 유의하게 높았고, 그레놀리카텔라, 스타필로코커스, 스트렙토코커스 및 베일로넬라의 상대적 풍부도는 비 NHA이 군보다 NHA이 군에서 유의하게 낮았다.
- [0012] 기관 내 튜브 흡인물의 미생물군은 NHA이에 대한 위험 인자가 있는 환자와 없는 환자 사이에서 구별되었다. 따라서, 폐 미생물군은 요양원 및 병원 환경에 노출된 삼관 환자에 대한 바이오마커 및 치료 표적으로 이용할 수 있다.
- [0014] 본 발명은
- [0015] 기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;
- [0016] 수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0017] 추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;
- [0018] 증폭된 서열을 분석하는 단계;
- [0019] 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계; 및
- [0020] 분류학적 할당 결과, 그레놀리카텔라 (*Granulicatella*) 속, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 스타필로코커스 (*Staphylococcus*) 속 및 베일로넬라 (*Veillonella*) 속 중 1종 이상의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 낮은 경우 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHA이)인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은
- [0022] 기계적 인공호흡 환자로부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;
- [0023] 수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0024] 추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;
- [0025] 증폭된 서열을 분석하는 단계;
- [0026] 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계; 및
- [0027] 분류학적 할당 결과, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 높은 경우 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHA이)인 것으로 판정하는 단계;를 포함하는 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 호흡기 시료가 기관 내 흡인으로 얻은 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 호흡기 시료가 기계적 인공호흡 개시로부터 1일 내지 7일 중 하나 이상의 날짜에 수집한 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 분류학적 할당이 16S 미생물 데이터베이스를 참조하여 BLASTN (2.4.0)을 사용하여 가장 유사한 종에 대한 정보를 얻는, 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 프라이머가 원핵생물 16S rRNA 유전자의 V3 또는 V4 영역 중 하나 이상의 영역을 표적으로 하는 것인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0032] 실제 실험에서는 16S rRNA 부분에 대하여 2번에 걸쳐 PCR을 진행하였다.
- [0033] 1차 PCR에 사용한 프라이머는 다음과 같다.
- [0034] 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

- [0035] 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'
- [0036] 2차 PCR에 사용한 프라이머는 다음과 같다.
- [0037] 518F 5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3'
- [0038] 907R 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속이 코리네박테리움 열서란스 (*Corynebacterium ulcerans*)인, 호흡기 미생물 프로파일링 방법에 관한 것이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 코리네박테리움 속을 검출하기 위한 프라이머-프로브 세트를 포함하며, 기계적 인공호흡 환자로 부터 분리된 호흡기 시료를 가하여 코리네박테리움 속의 존재를 판별하는 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI) 위험 인자 탐지용 PCR 키트에 관한 것이다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 코리네박테리움 속이 코리네박테리움 열서란스인, 요양원 및 병원 관련 감염 위험 인자 탐지용 PCR 키트에 관한 것이다.
- [0042] 또한, 본 발명은 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속을 검출하기 위한 프라이머-프로브 세트를 포함하는 요양원 및 병원 관련 감염 위험 인자 탐지용 PCR 칩에 관한 것이다.
- [0043] 상기 요양원 및 병원 관련 감염 위험 인자 탐지용 PCR 키트 및 PCR 칩은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 프라이머 및 프로브 서열을 이용하여 용이하게 제조할 수 있으므로, 자세한 기술은 생략한다.
- [0044] 다운스트림 데이터 분석은 EzBioCloud 16S rRNA 유전자 서열 데이터베이스를 이용하여 QIIME으로 수행하였다.
- [0045] 또한, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속, 그레놀리카텔라 (*Granulicatella*) 속, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 속 및 베일로넬라 (*Veillonella*) 속의 프라이머 및 프로브는 EzBioCloud 데이터베이스 검색을 통해 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 쉽게 디자인할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은
- [0047] 기계적 인공호흡 환자로 부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;
- [0048] 수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0049] 추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;
- [0050] 증폭된 서열을 분석하는 단계;
- [0051] 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계;
- [0052] 분류학적 할당 결과, 그레놀리카텔라 (*Granulicatella*) 속, 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 속, 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 속 및 베일로넬라 (*Veillonella*) 속 중 1종 이상의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 낮은 경우 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계; 및
- [0053] 요양원 및 병원 관련 감염인 것으로 판정된 경우, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제를 투여하는 단계;를 포함하는 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 또한, 본 발명은
- [0055] 기계적 인공호흡 환자로 부터 분리된 호흡기 시료를 수집하는 단계;
- [0056] 수집한 시료로부터 DNA를 추출하는 단계;
- [0057] 추출한 DNA를 프라이머를 사용하여 증폭하는 단계;
- [0058] 증폭된 서열을 분석하는 단계;
- [0059] 서열 분석 결과 얻어진 판독값으로부터 분류학적 할당을 수행하는 단계;
- [0060] 분류학적 할당 결과, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속의 상대적 풍부도가 일반 대조군에 비하여 높은 경우 요양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHAI)인 것으로 판정하는 단계;

및

- [0061] 영양원 및 병원 관련 감염인 것으로 판정된 경우, 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제를 투여하는 단계;를 포함하는 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0062] 또한, 본 발명은 상기 코리네박테리움 속이 코리네박테리움 열서란스인, 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0063] 또한, 본 발명은 상기 코리네박테리움 (*Corynebacterium*) 속에 효과적인 항생제가 β -락탐, 아미노글라이코사이드 (aminoglycosides) 및 글라이코펩타이드제 (glycopeptides agents) 중 1종 이상인, 기계적 인공호흡 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0065] 헬스케어 관련 폐렴 (HCAP)에 걸린 것으로 분류된 환자들 사이에는 이중성이 존재한다 (14). 기존의 HCAP 기준은 병원성 병원체의 위험을 반영하지 않았고 광범위한 항생제의 남용을 유발했기 때문에 2016 HAP/VAP 지침에는 HCAP 기준이 포함되지 않았다 (1, 7). HCAP 정의에 대한 대안을 찾고 치료를 개별화하려는 시도가 이루어졌다 (8, 11, 14). 이러한 결과를 바탕으로 우리는 본 발명에서 MDR (Multidrug Resistance) 병원체를 더 잘 예측할 수 있고 헬스케어 시스템과 병원체의 지속적인 노출을 반영할 수 있을 것으로 기대되는 새로운 영양원 및 병원 관련 감염 (NHA) 개념을 정의한다.
- [0066] 기존 미생물 배양법을 사용한 최근 연구들은 국가와 지역에 따라 차이가 있었다 (26-29). 미국과 아시아/태평양 지역의 연구에서는 HCAP에서 약물 내성 병원체의 빈도가 더 높았지만 (26-28, 30), 다른 연구에서는 HCAP의 병원체가 CAP (community-acquired pneumonia)의 병원체와 유사하다고 밝혀졌다 (29).
- [0067] 배양법 비의존적인 16S rRNA 유전자 서열분석은 기존의 배양 방법과 달리 과소 평가되는 경향이 있는 까다로운 세균을 탐지하는 데 유용하다 (31). 우리가 아는 한, 본 발명은 삼관 환자의 호흡기 미생물이 헬스케어 시설 및 병원 관련 위험 요소에 의존하는지 여부를 결정하기 위해 16S rRNA 서열분석 방법을 사용하는 첫 번째 연구이다.
- [0068] 본 발명의 가장 중요한 발견은 삼관 환자의 기관 내 흡인물 (ETA) 미생물군 프로파일이 새롭게 정의된 NHA 위험 인자와 유의하게 관련되어 있다는 것이었다. 평균적으로, NHA 위험 인자가 없는 환자는 NHA 위험 인자가 있는 환자에 비해 미생물 다양성이 높은 것으로 나타났다. 비가중 UniFrac 거리 (unweighted UniFrac distances)에 기초한 베타-다양성의 분석 결과는 NHA 군과 비 NHA 군으로 식별된 시료의 뚜렷한 군집을 보여주었다. 미생물 다양성을 넘어서, 우리는 특정 박테리아 속이 헬스케어 시스템 및 병원에 지속적으로 노출되는 것과 관련이 있음을 발견했다.
- [0069] NHA 위험 인자를 가진 삼관 환자에서 코리네박테리움 (*Corynebacterium*)의 풍부도는 증가하는 반면, 그레놀리카텔라 (*Granulicatella*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 및 베일로넬라 (*Veillonella*)의 풍부도가 감소함을 발견했다. 특히, 코리네박테리움 속의 구성원은 비 폐렴 환자보다 삼관 환자에서 상당히 풍부했으며, 폐렴군에서 *C. ulcerans*의 풍부도는 시간이 지남에 따라 증가하는 경향이 있었다. 코리네박테리움 속은 비 인두의 공생 식물군 중 하나이며 (32), 폐렴을 일으키는 역할은 최근에 설명되었다 (33-36). 코리네박테리움 아종의 식별은 현재 MALDI-TOF 및 16S rRNA 유전자 시퀀싱과 같은 새로운 진단 기술을 사용하여 가능하다 (13, 33-35, 37). 이러한 연구에 기초하여 Clariot 등은 코리네박테리움 속이 인공호흡 환자의 폐렴의 원인이 될 수 있다고 보고했으며, 이는 우리의 결과와 유사하다 (33). 반면, Yasuda 등은 *C. ulcerans*가 중앙 기도에서 디프테리아 독소를 생성하고 확산성 유사막 형성에 의해 중증 폐렴을 유발했다고 보고했다 (30). 코리네박테리움 아종은 또한 헬스케어 관련 폐렴의 원인이 될 수도 있다. 일본인 환자들로부터 얻은 기관지 폐포 세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid; BALF)의 분석은 HAP (hospital-acquired pneumonia) 환자 시료의 11.8%, HCAP 환자 시료의 4.9%이지만, CAP (community-acquired pneumonia) 환자의 시료 중에서는 1.6%에서만 코리네박테리움 속이 분리되었음을 보여주었다 (37). 본 발명의 결과는 코리네박테리움 아종이 헬스케어/병원 관련 병원체로 간주되어야 할 필요성을 설명해준다.
- [0070] 몇몇 연구는 분자 기술을 사용하여 예기치 않은 미생물이 폐렴의 특정 표현형과 관련이 있음을 보여주었다. 예컨대, Steenhuisen 등은 CAP 환자에서 락토바실러스와 로티아 (*Rothia*)가 증가한 것을 발견한 반면, Zarkharkina 등은 인공호흡기 관련 폐렴 (ventilator-associated pneumonia; VAP)에서 이러한 미생물의 감소를 보고하였다 (38, 39). 본 발명의 결과와 유사하게, 성인 ICU 환자에 대한 어떤 연구는 프리보텔라 (*Prevotella*)

a)가 대조군에서 우세한 반면, 코리네박테리움 속은 VAP 코호트에서 독특하게 존재함을 밝혔다 (40).

[0071] Segal 등은 구강 분류군 (예컨대, 스트렙토코커스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라 및 프리보텔라)인 폐 미생물군이 둔화된 TLR4 반응을 나타내는 Th17/호중구 표현형의 숙주 세포 점막 면역을 유도함을 밝혀냈다 (41). Kitsioset 등은 구강 분류군에 의한 폐 미생물군의 우위는 배양 음성 (culture negativity) 및 낮은 수준의 숙주 면역 반응과 밀접한 관련이 있다고 보고했다 (42). 이러한 기존의 자료에 근거하여, 구강 분류군이 우세한 비 NHA이 군은 NHA이 군보다 면역 반응이 약할 수 있음을 유추할 수 있다. 이것은 HCAP 환자가 더 심각한 질병을 나타내며 병원성 폐렴과 유사한 개별 임상 결과를 나타낸다는 이전의 보고와 일치한다 (26, 28, 43).

[0072] 본 발명의 데이터는 임상 결과에 따른 미생물 군집의 차이를 보여주지 않았으며 이는 폐 미생물군으로부터 중환자의 결과를 예측할 수 있다는 것을 보여준 Dickson 등의 연구와 대조적이다 (44). 이러한 불일치는 연구 모집단과 표본 추출 방법의 차이 (ETA 대 BALF) 때문일 수 있다.

[0073] 우리의 연구에는 장점이 있다. 참가자는 비슷한 나이의 노인만으로 구성되었으며, 여러 개의 연속 시료를 채집했다. 분석 결과, NHA이 관련 미생물군은 항생제 사용 또는 시간에 관계없이 일정하다는 것을 보여주었다.

[0074] 결론적으로, 인공 호흡기 환자에 대한이 전향적 관찰 코호트 연구에서 호흡기 미생물 군집의 다양성 상실 및 미생물 불균형 (dysbiosis)은 NHA이 위험 인자가 없는 환자보다 NHA이 위험 인자가 있는 환자에서 더 심각하다. NHA이 위험 인자는 코리네박테리움과 양의 관계가 있고, 그레놀리카텔라, 스트렙토코커스, 스태필로코커스 및 베일로넬라와는 음의 관계가 있었다. 미생물군 프로파일링의 임상적 관련성을 조사하고 NHA이 위험 인자를 갖는 중환자에서 새로운 치료 표적을 찾기 위해 미래의 전향적 연구가 필요하다.

발명의 효과

[0076] 본 발명의 호흡기 미생물 프로파일링 방법은 헬스케어 관련 폐렴 환자 중 기계적 인공호흡 중인 중환자실 환자에게 영양원 및 병원 관련 감염 (nursing home and hospital associated infection; NHA이) 위험 인자가 있는지를 확인할 수 있도록 함으로써 적합한 항생제의 투여를 가능하게 하여 환자의 생존율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 시간 경과에 따른 연구 참가자의 기관 내 흡인물 미생물군의 상대적 풍부도를 나타낸다. 폐렴군 및 비폐렴군 (a), 또는 NHA이 군 및 비 NHA이 군 (b)의 180개 시료의 분류학적 요약.

도 2는 폐렴 환자에서 코리네박테리움 얼서란스 풍부도가 증가함을 보여준다. (a) 폐렴군 및 비폐렴군에서 각각 코리네박테리움 OTU의 더 빈번한 발생을 보여준다. (b) 폐렴군 및 비폐렴군에서 코리네박테리움 얼서란스 OTU의 상대적 풍부도의 종 패턴을 나타낸다.

도 3. (a) NHA이 군 (그룹 1)과 비 NHA이 군 (그룹 0) 사이의 다양한 알파-다양성 매트릭스 비교, (b) 가중 Unifrac 거리를 기반으로 한 NHA이 위험 인자에 따른 기관 내 흡인물 (ETA)의 미생물군 구조. NHA이 군과 비 NHA이 군 사이의 미생물 군 구조를 비교하기 위해 전변이 다변량 분산 분석 (PERMANOVA) (비건 R 패키지의 아도니스 기능)을 사용하였다. PERMANOVA는 연령, 성별, APACHE 점수 및 찰슨 동반 질환 지수 (CCI)를 조정하여 수행되었다.

도 4. NHA이 군과 비 NHA이 군에서 우세한 속 OTU의 상대적 풍부도의 종방향 패턴.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0081] <방법>

[0082] 대상 및 연구 디자인

[0083] 2017년 7월부터 2018년 10월 사이에 춘천 성심병원의 중환자실에 입원한 환자들이 전향적으로 모집되었다. 중환

자실 입원시 기계적 인공호흡을 시작한 모든 환자가 포함되었다. 배제 기준은 18세 미만, 중환자실 입원 후 48 시간 초과 후 기계적 환기 개시 및 7일 미만의 기계적 환기 지속 기간이었다.

[0084] 2005년 미국 감염증 협회/미국 흉부학회 가이드라인 (American Infectious Disease Society of America/American Thoracic Society Guidelines)은 병원 폐렴과 유사한 치료법이 필요한 새로운 폐렴 카테고리 로 헬스케어 관련 폐렴 (HCAP)을 도입했으며 HCAP 치료를 위해 광범위한 항생제를 권장한다 (3). 그러나 여러 연구에 따르면 HCAP는 이질적인 질병이며 HCAP를 가진 모든 환자에게 광범위한 항생제 치료가 불필요할 수 있다 (6, 8, 14). 따라서 HCAP의 개념은 포기되었고 다 약물 내성 (multidrug resistant) 병원체에 대한 위험 인자를 사용하여 HCAP의 정의를 세분화하는 시도가 이루어졌다. 이용 가능한 연구 데이터 (5, 8, 10, 12, 14, 15)에 기초하여, 우리는 NHA이 군의 새로운 개념을 (1) 기능이 불량한 상태의 영양원 거주자; (2) 지난 90일 내에 입원; (3) 지난 6개월 내의 항생제 치료; 중 하나 이상을 가진 환자로 정의했다.

[0085] 최종적으로 60명의 환자 (폐렴 41명과 비폐렴 19명)를 NHA이 군과 비 NHA이 군으로 나누고 전향적으로 추적 조사 하였다. 이 연구는 춘천성심병원 임상시험 심사위원회 승인을 받았다 (IRB 승인번호: 2017-47).

[0087] 데이터 수집 및 임상 결과

[0088] 환자의 인구 통계학적 특성 (연령, 성별 및 기존의 동반질환), 삽관 표시, ARDS (급성 호흡기 장애 증후군, Acute respiratory distress syndrome) 존재, SaO₂/FiO₂ 비, GCS (Glasgow Coma Scale), 급성 생리학 및 만성 건강 평가 (APACHE II) 점수 및 순차적 기관 장애 평가 (SOFA) 점수가 기록되었고, 찰슨 동반질환 지수 (CCI)는 이전 문헌에 따라 계산되었다 (16). 임상 결과는 28일차 모든 원인 및 최종 병원 사망률이었다. 호흡기 치료는 기관 내 흡인으로 얻었다. 일련의 치료 수집은 기계적 환기 개시로부터 1일, 3일 및 7일에 수행되었다.

[0090] DNA 추출, PCR 및 파이로시퀀싱

[0091] 유전체 DNA를 상업적 미생물 DNA 분리 키트 (MP Biomedicals, USA)를 사용하여 추출하고, 추출한 DNA를 원핵생물 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 앰플리콘은 XSEP MagBead (CELEMICS)를 이용하여 정제하고 Nextera Index Kit (Illumina, USA)를 이용하여 PCR 하였다. 결과물은 XSEP MagBead (CELEMICS)를 이용하여 더 정제하였다. 제조된 세균 앰플리콘 라이브러리는 정량하고 다중 라이브러리 와 혼합한 다음, MiSeq v3 플랫폼 (Illumina)을 사용하여 서열 분석하였다.

[0092] 서열분석 원시 데이터 파일은 다운스트림 데이터 분석 전에 전처리되었다. 낮은 품질의 스코어를 갖는 서열을 제거하기 위해, 원시 서열 판독을 PRINSEQ (17)을 사용하여 사전 여과하였다. 어댑터 서열은 CUTADAPT (18)을 사용하여 제거하였다. PEAR (19)를 사용하여 페어 드 엔드 판독값을 병합한 다음 PRINSEQ로 필터링했다. USEARCH (20)를 사용하여 키메라 서열 및 싱글톤을 스크리닝하고 감소시켰다. 마지막으로 180개의 시료를 분석 하고 시료당 평균 133,219개의 판독값을 얻었다 (최소, 29,247; 최대, 587,337). 다운스트림 데이터 분석은 EzBioCloud 16S rRNA 유전자 서열 데이터베이스 (22)와 함께 QIIME (21)을 사용하여 수행되었다. 운영 분류 단위 (Operational taxonomic units; OTU)는 97% 이상의 동일성을 갖는 서열의 클러스터로 정의되었다.

[0094] 데이터 가공 및 통계 분석

[0095] 미생물 생태학 소프트웨어 (QIIME, v. 1.8)의 Quantitative Insights와 R 패키지 Vegan을 사용하여 다양한 미생물군 비교를 수행했다.

[0096] ETA로부터의 미생물 서열은 554속 및 2,009종을 나타냈다. 각각의 대상체는 2개의 상이한 시점 (1일 및 3일 또는 7일)에 2회 서열분석되었다. 두 시점에 대한 각각의 대상체의 절대 OTU를 합하고, 종을 2가지 기준으로 여과 하였다; 1) 소수의 환자에게만 나타나는 군주 제거, 2) OTU 1000 미만의 군주 제거.

[0097] 최종적으로, 11개의 우세한 속 (*Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Mycoplasma*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Campylobacter*)과 8종의 우세 종 (*Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus mitis*, *Corynebacterium ulcerans*, *Staphylococcus caprae*, *Veillonella adispas*, *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus lactarius*)을 통계 분석에 사용하였다.

[0098] 알파 다양성은 Ace, Chao1, Shannon 지수 및 Simpson 지수로 표현되었다. 베타 다양성 지수 (시료 간 다양성)는 공유 구조의 정도에 따라 미생물 군 간의 유사성 정도로 정의되었다. 표준화된 Unifrac 거리를 기반으로 하는 비 미터법 다차원 스케일링 플롯을 사용하여 미생물군 구조의 군간 차이를 시각화했다. 원리 좌표 분석 플롯을 1000개의 치환과 함께 치환 다변량 분산 분석 (PERMANOVA; 함수 아도니스)을 사용하여 적용하였다.

[0099] 각 OTU의 풍부도에 대한 폐렴과 NHAI 위험 인자의 연관성을 확인하기 위해 통계 분석을 수행했다. 각 대상은 2개의 상이한 시점에서 측정되었고, 표준화된 선형 혼합 효과 모델 (GLMM)을 사용하여 반복적으로 관찰된 측정값을 처리하였다. 폐렴 및 NHAI 위험 인자는 반응 변수로 간주되었다. 각 시점에서 OTU의 상대적 풍부도는 Log2 전환되었고, 이를 공변량으로 포함시켜 효과를 평가하였다. 우리는 또한 다양한 결과 유형으로 시간 경과에 따른 마이크로바이옴의 종방향 변화를 탐지하기 위해 쌍방향 및 종방향 거리 기반 접근법 (Pldist)을 고려했다 (23). 또한, 시점 사이의 Gower의 거리, Bray-Curtis의 비 유사성, Jaccard 거리 및 Kulczynski 거리와 같은 비-계통 발생적 비유사성의 차이를 계산할 수도 있다. 마지막으로 폐렴과 NHAI 위험 인자는 시간에 따라 변하지 않으므로 단면 데이터에 대한 세 가지 방법을 고려한다. TMAT (phylogenetic tree-based microbiome association test), 윌콕슨 테스트 및 참조 프레임 방법 (24,25). 단면적 방법의 경우, 두 가지 다른 지점에서 로그 변환된 백만 분당 읽기 횟수 (CPM)의 수단이 응답 변수로 간주되었다. 모든 접근법 중에서 GLMM과 TMAT만이 다른 공변량의 효과를 조정할 수 있으며 연령, 성별, APACHE 점수 및 CCI가 공변량으로 포함되었다. GLMM은 SAS 9.4 (Cary, NC)로 수행되었으며 다른 분석은 R 소프트웨어로 수행되었다. 모든 시험 결과는 p 값 ≤ 0.05 를 사용하여 유의한 것으로 간주하였다.

[0101] <결과>

[0102] 연구 참여자의 특징

[0103] 기계적 환기를 시작한 60명의 환자가 이 연구에 포함되었다. 41명의 환자는 폐렴으로 분류되었고 24명의 환자는 NHAI 위험 요인이 있었다. 표 1은 환자 특성을 보여준다. ARDS 환자 비율, CRP (C-reactive protein) 수준 및 paO_2/FiO_2 수준은 비 폐렴 환자보다 폐렴 환자에서 예상대로 높았다. NHAI 군과 비 NHAI 군은 성별, 심각도 지수 (APACHE 및 SOFA 점수) 및 GCS 척도 측면에서 차이가 없었다. 반면, NHAI 군은 비 NHAI 군보다 나이가 많고 동반 질환이 더 많았다. 그러나 28일 모든 원인 사망률 또는 최종 병원 사망률은 두 군 간에 차이가 없었다.

표 1

	Pneumonia n=41	Non- pneumonia n=19	P value	NHAI n=24	Non NHAI n=36	P value
Age*	73 (61-79)	76 (59-81)	0.744	78 (72-85)	71 (57-77)	0.004
Male*	30 (73.2%)	12 (63.2%)	0.431	15 (62.5%)	27 (75.0%)	0.391
ARDS	8 (19.5%)	0 (0%)	0.047	4 (16.7%)	4 (11.1%)	0.702
Pneumonia				23 (95.8%)	19 (52.8%)	<0.001
Charlson Comorbidity Index*	3 (1-4)		0.085	3 (2.3-5.0)	1.5 (0-2.8)	<0.001
Cause of intubation			<0.001			<0.001
Cardiac arrest	1 (2.4%)	3 (15.8%)		0 (0.0%)	4 (11.1%)	
Neurological distress	5 (12.2%)	13 (68.4%)		1 (4.2%)	17 (47.2%)	
Post-operative status	0 (0%)	1 (5.3%)		0 (0.0%)	1 (2.8%)	
Respiratory	35 (85.4%)	2 (10.5%)		23 (95.8%)	14 (38.9%)	
PaO ₂ /FiO ₂ ratio	212 (133.5-299)	431 (321-458)	<0.001	222 (131.3-301.0)	323 (184.3-442.5)	0.022
Severity						
APACHE II score*	20 (16-24)	22 (17-25)	0.202	20.5 (16.3-24.0)	21 (17-25)	0.634
SOFA score*	7 (6-9)	6 (4-9)	0.117	7 (6-9)	7 (5-9)	0.569
GCS*	8 (6-11)	6 (5-9)	0.074	8.5(6.0-10.8)	7.5 (6-9)	0.303
Extubation success in 3 weeks	23 (56.1%)	11 (57.9%)	0.999	14 (58.3%)	20 (55.6%)	0.999
28-day all-cause mortality	12 (29.3%)	6 (31.6%)	0.999	7 (29.2%)	11 (30.6%)	0.999
Final hospital mortality	19 (46.3%)	6 (31.7%)	0.4	11 (45.8%)	14 (38.9%)	0.606
MV duration*	13 (8-18)	10 (7-16)	0.335	13 (8-17.5)	10 (7.0-16.8)	0.384
CRP (mg/dL)	133 (45-213.5)	21 (5-132)	0.008	124.5 (62.8-192.0)	94 (8.0-194.0)	0.127

* median (interquartile range) † frequency (%) § median (range)

ARDS: acute respiratory distress syndrome
APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
GCS: Glasgow Coma Scale
MV: mechanical ventilation
CRP: C-reactive protein

[0104]

[0105]

환자군 (폐렴군 대 비폐렴군, NHAI 군 대 비 NHAI 군) 사이의 기관 내 튜브 흡인물의 미생물 조성의 차이는 분류학적 요약 (도 1)에 나와있다. 폐렴군에서는 코리네박테리움, 스태필로코커스 및 슈도모나스의 평균 풍부도가 비 폐렴군보다 높았다. 스트렙토코커스와 프리보텔라의 상대적 풍부도는 비 NHAI 군에서 더 높았으나, 반면 코리네박테리움의 상대적 풍부도는 NHAI 군에서 더 높았다.

[0107]

폐렴 환자 또는 비폐렴 환자에서 기계적 인공호흡 중 호흡기 미생물

[0108]

알파 다양성과 베타 다양성은 폐렴 환자와 비폐렴 환자 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 폐렴과 미생물 분류군 간의 연관성은 TMAT 및 기타 방법을 사용하여 분석되었다 (표 2). 나이, 성별, APACHE 점수 및 CCI의 효과는 Wilcoxon을 제외하고 TMAT, OMiAT 및 GLMM에 대해 조정되었다. 코리네박테리움과 폐렴군 사이의 양의 상관관계는 TMAT를 사용한 분석에 의해 확인되었다. GLMM 시험을 통해 코리네박테리움 얼서란스가 폐렴 환자와 비폐렴 환자 사이에서 현저히 다른 풍부도를 나타내는 것을 확인하였다 ($P = 0.035$).

[0109]

TMAT, 최적의 미생물 군계 연관성 검사 (OMiAT) 및 GLMM에서 연령, 성별, APACHE 및 CCI 점수의 영향을 조정하여 폐렴과 미생물 분류군 사이의 연관성을 분석하였지만 (표 2), Wilcoxon 시험에서는 그렇지 않았다. 코리네박테리움과 폐렴 사이의 상관관계는 TMAT에 의해 입증되었으며, 반면, GLMMs를 통해 폐렴 환자와 비폐렴 환자 사

이에 *C. ulcerans*의 풍부도에서 유의한 차이를 확인하였다 ($P = 0.035$).

표 2

Genus	FDR-OMiAT	Beta-TMAT	FDR-TMAT	Estimate-RF	FDR-RF	FDR-Wilcoxon	β -GLMM	FDR-GLMM
<i>Acetobacter</i>	0.7832	0.02	0.7321	NA	NA	0.6809	0.014	0.7855
<i>Corynebacterium</i>	0.2791	0.1	0.0226	-2.03	0.9985	0.005	0.102	0.4899
<i>Granulicatella</i>	0.7832	-0.04	0.3564	-1.89	0.9985	0.3817	-0.104	0.4899
<i>Staphylococcus</i>	0.7832	-0.01	0.8202	0.09	0.9985	0.9556	0.026	0.725
<i>Streptococcus</i>	0.2791	-0.03	0.7321	0	0.9985	0.3817	-0.04	0.6638
<i>Veillonella</i>	0.7832	-0.03	0.708	0.35	0.9985	0.6809	-0.065	0.5494

FDR: false discovery rate

OMiAT: optimal microbiome-based association test

TMAT: phylogenetic-tree-based microbiome association test

RF: reference frame

GLMM: generalized linear mixed model

도 2a는 비폐렴군보다 폐렴군에서 코리네박테리움 속의 상대적 풍부도가 증가함을 보여준다. 이 풍부도의 차이는 주로 *C. ulcerans*라는 종에 의해 발생한다. 시료에서 검출된 다른 코리네박테리움 종은 폐렴군과 비폐렴군 간에 유의미한 차이를 보이지 않았다. 도 2b는 1일째 및 7일째에 코리네박테리움 열서란스가 비폐렴군보다 폐렴군에서 증가하고 폐렴군과 비폐렴군 사이에 코리네박테리움의 OTU 비율 차이가 7일에 더 큰 경향이 있음을 보여준다.

NHAI 위험 인자가 있는 환자와 없는 환자의 기계적 인공호흡 중 호흡기 미생물

알파 다양성 분석은 NHAI 군과 비 NHAI 군 사이에 유의한 차이를 나타냈다 (중간값 [사분위 범위]로 표시됨; 도 3a). 비 NHAI 군에 비해 NHAI 군은 Ace (67.5 [48.2, 108.9] 대 139.9 [106.2, 215.7]; $P < 0.001$), Chao (64.4 [45.3, 112.0] 대 137.5 [106.2, 230.6]; $P < 0.001$), 새넨 지수 (2.3 [0.7, 2.9] 대 3.8 [2.3, 4.7]; $P < 0.001$) 및 심슨 지수 (0.7 [0.2, 0.8] 대 0.9 [0.6, 0.9]; $P < 0.001$)에서 낮은 값을 나타냈다. NHAI 군의 미생물군 구조는 또한 β - 다양성 (PERMANOVA, $P < 0.001$ 로 조정됨, 도 3b)에 기초하여 비 NHAI 군의 미생물군과 명확하게 구별될 수 있다. NHAI와 관련된 미생물 분류군은 표 3에 나타난 방법을 사용하여 확인되었다. TMAT, OMiAT 및 GLMM에서 연령, 성별 및 APACHE 및 CCI 점수는 조정했지만 Wilcoxon 시험에서는 조정하지 않았다. TMAT 및 Wilcoxon 분석 결과, *Granulicatella*, *Streptococcus* 및 *Veillonella*는 NHAI 군과 음의 상관관계를 보였으며 *Corynebacterium*은 양의 상관관계를 나타냈다 (표 3).

표 3

Genus	FDR-OMiAT	β -TMAT	FDR-TMAT	Estimate-RF	FDR-RF	FDR-Wilcoxon	Beta-GLMM	FDR-GLMM
<i>Acinetobacter</i>	0.5861	-0.08	0.0807		NA	0.52	-0.039	0.6165
<i>Corynebacterium</i>	0.1788	0.2	0.0004	3.21	0.3302	<0.05	0.17	0.2166
<i>Granulicatella</i>	0.1911	-0.18	0.0002	-1.15	0.8524	<0.05	-0.318	0.0385
<i>Staphylococcus</i>	0.2129	-0.14	0.023	-2.22	0.8524	0.344	-0.142	0.2166
<i>Streptococcus</i>	0.2129	-0.09	0.0132	3.1	0.8524	0.0045	-0.067	0.4439
<i>Veillonella</i>	0.5861	-0.11	0.0101	-0.39	0.8611	0.0045	-0.136	0.2166

FDR: false discovery rate

OMiAT: optimal microbiome-based association test

TMAT: phylogenetic-tree-based microbiome association test

RF: reference frame

GLMM: generalized linear mixed model

[0115]

[0116]

마찬가지로, GLMM 방법은 *Granulicatella*와 *Prevotella*가 비 NHA1 군에서 더 풍부하고 종 수준에서는 *Corynebacterium ulcerans*가 NHA1 군에서 더 풍부하고 *Granulicatella adiacens*가 비 NHA1 군에서 더 풍부하다는 것을 밝혔다 (표 4). 표 4는 GLMM 분석에서 ETA 박테리아 분류군과 NHA1 군의 상대적 풍부도 사이의 연관성을 나타내는 통계 매개 변수를 나타낸다.

표 4

Type	Beta estimate (FDR <i>P</i> value)				
	OTU name	Total group (n=60)		Pneumonia (n=41)	
Genus	<i>Acinetobacter</i>	-0.039	0.616	-0.117	0.432
	<i>Streptococcus</i>	-0.067	0.443	-0.006	0.948
	<i>Corynebacterium</i>	0.17	0.216	0.143	0.432
	<i>Staphylococcus</i>	-0.142	0.216	-0.25	0.207
	<i>Prevotella</i>	-0.233	0.038	-0.24	0.207
	<i>Neisseria</i>	0.023	0.773	0.045	0.702
	<i>Veillonella</i>	-0.136	0.216	-0.105	0.432
	<i>Mycoplasma</i>	-0.134	0.248	-0.081	0.588
	<i>Granulicatella</i>	-0.318	0.038	-0.287	0.207
	<i>Actinomyces</i>	-0.134	0.228	-0.076	0.588
Species	<i>Campylobacter</i>	-0.15	0.228	-0.102	0.588
	<i>Acinetobacter_baumannii</i>	-0.064	0.371	-0.121	0.371
	<i>Streptococcus_mitis</i>	-0.153	0.215	-0.065	0.491
	<i>Corynebacterium_ulcerans</i>	0.293	0.018	0.22	0.115
	<i>Staphylococcus_caprae</i>	-0.194	0.128	-0.367	0.115
	<i>Veillonella_dispar</i>	-0.137	0.167	-0.105	0.371
	<i>Granulicatella_adiacens</i>	-0.336	0.018	-0.311	0.115
	<i>Streptococcus_parasanguinis</i>	-0.145	0.215	-0.079	0.491
	<i>Streptococcus_lactarius</i>	-0.153	0.215	-0.104	0.491

[0119]

도 4는 NHA1 위험 인자에 따른 관련 미생물 분류군의 종방향 추세를 보여준다. 1일째와 7일째에 *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella* 및 *Streptococcus*는 NHA1 군에 비해 비 NHA1 군에서 더 높은 OTU 수를 나타냈다. 반면, 코리네박테리움은 비 NHA1 군에 비해 NHA1 군에서 더 풍부했다. 그러나, 각 미생물 분류군의 종 방향 변화는 각 질병 표현형에 대해 유의하지 않았다.

[0121] 임상 결과에 따른 호흡기 미생물의 종방향 변화

[0122] 우리는 MIREKAT (microbiome regression-based kernel association test)을 사용하여 Pldist에 기반한 비 계통 발생적 비유사성과 임상 결과 (28일 모든 원인 병원 사망률 및 최종 병원 사망률)와의 연관성을 조사하였다. 결과는 호흡기 미생물군의 다양성이 임상 결과와 관련이 없음을 보여준다 (표 5). GLMM 분석 결과도 유사한 결과를 나타냈다. 폐렴군과 비폐렴군 모두에서 28일 모든 원인 병원 사망률과 최종 병원 사망률에 따른 미생물 OTU의 차이는 없었다 (표 6).

표 5

	28-day all-cause mortality		Final hospital mortality	
	Species	Genus	Species	Genus
Total (n=60)				
Bray-Curtis	0.15	0.63	0.45	0.24
Jaccard	0.33	0.57	0.48	0.22
Kulczynski	0.34	0.58	0.42	0.32
Gower	0.29	0.45	0.43	0.23
Pneumonia (n=41)				
Bray-Curtis	0.3	0.76	0.54	0.36
Jaccard	0.51	0.63	0.43	0.26
Kulczynski	0.5	0.69	0.28	0.3
Gower	0.29	0.63	0.38	0.44
Non-pneumonia (n=19)				
Bray-Curtis	0.65	0.14	0.65	0.14
Jaccard	0.66	0.5	0.66	0.5
Kulczynski	0.75	0.62	0.75	0.62
Gower	0.71	0.13	0.71	0.13

[0123]

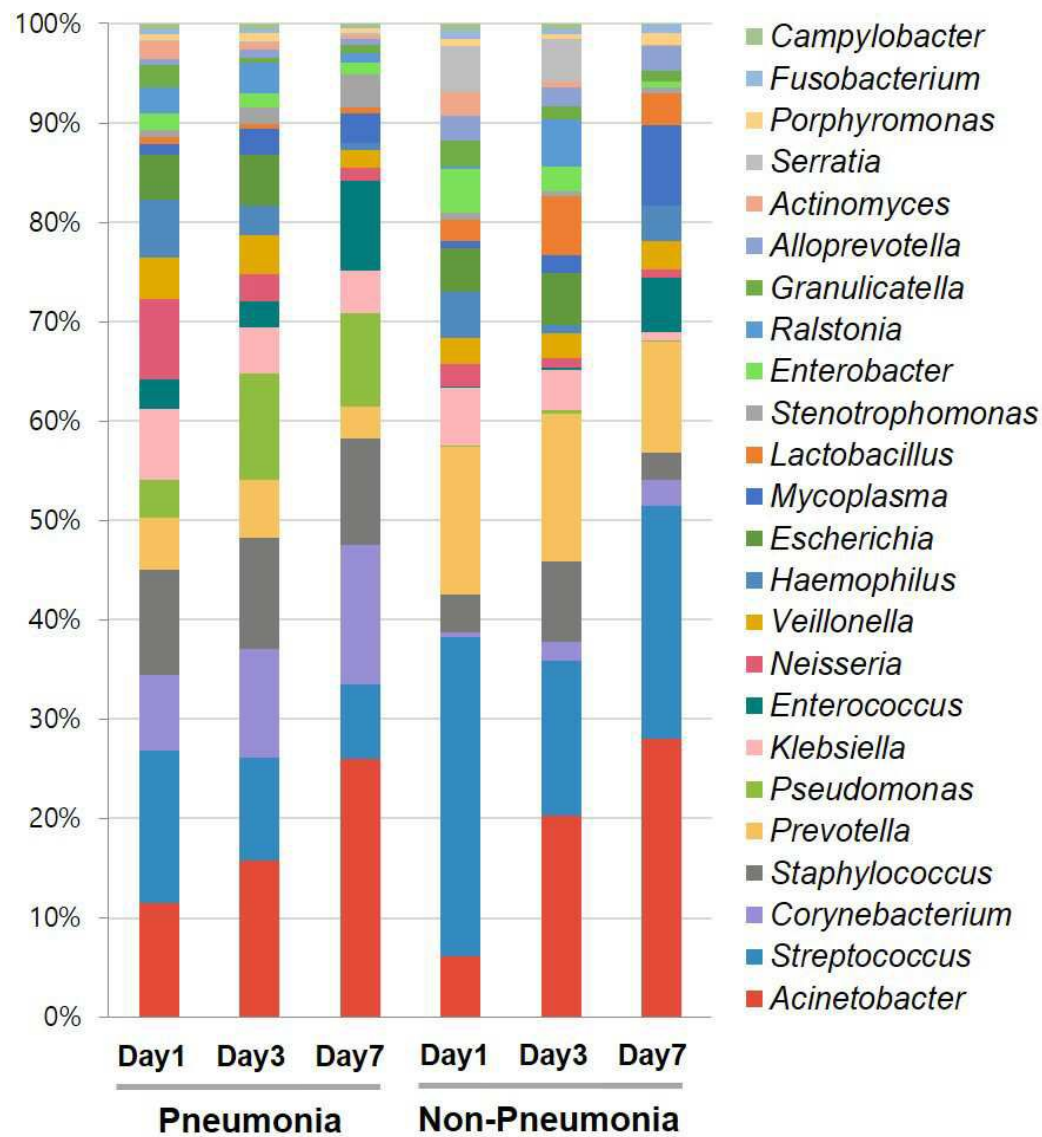
표 6

Type	Effect	28-days death			Final death		
		Total	Pneumonia	Non-pneumonia	Total	Pneumonia	Non-pneumonia
Genus	Acinetobacter	-0.024(0.65)	-0.064(0.37)	0.087(0.39)	-0.004(0.94)	-0.036(0.58)	0.087(0.39)
	Actinomyces	-0.046(0.51)	-0.071(0.45)	-0.056(0.68)	-0.043(0.5)	-0.034(0.67)	-0.056(0.68)
	Campylobacter	-0.045(0.56)	-0.046(0.65)	-0.117(0.45)	-0.023(0.75)	0.014(0.87)	-0.117(0.45)
	Corynebacterium	0.065(0.33)	0.116(0.19)	-0.114(0.49)	0.048(0.45)	0.063(0.42)	-0.114(0.49)
	Granulicatella	-0.03(0.67)	-0.055(0.55)	0.007(0.96)	-0.006(0.92)	0.012(0.88)	0.007(0.96)
	Mycoplasma	-0.026(0.71)	0.026(0.77)	-0.308(0.14)	-0.031(0.65)	0.052(0.55)	-0.308(0.14)
	Neisseria	-0.066(0.36)	-0.054(0.53)	-0.219(0.25)	-0.006(0.92)	0.038(0.6)	-0.219(0.25)
	Prevotella	-0.024(0.68)	-0.029(0.7)	-0.073(0.54)	-0.023(0.67)	0.009(0.9)	-0.073(0.54)
	Staphylococcus	-0.05(0.4)	-0.052(0.45)	-0.07(0.6)	-0.049(0.38)	-0.052(0.43)	-0.07(0.6)
	Streptococcus	-0.084(0.19)	-0.121(0.14)	-0.058(0.63)	-0.065(0.27)	-0.073(0.33)	-0.058(0.63)
	Veillonella	-0.03(0.61)	-0.032(0.66)	-0.085(0.54)	-0.023(0.68)	0.002(0.98)	-0.085(0.54)
Species	Granulicatella adiacens	-0.029(0.69)	-0.053(0.57)	0.008(0.96)	-0.004(0.96)	0.017(0.84)	0.008(0.96)
	Acinetobacter baumannii	-0.044(0.46)	-0.09(0.26)	0.051(0.62)	-0.006(0.91)	-0.026(0.7)	0.051(0.62)
	Staphylococcus caprae	-0.03(0.65)	-0.024(0.76)	-0.069(0.61)	-0.03(0.64)	-0.016(0.83)	-0.069(0.61)
	Veillonella dispar	-0.036(0.56)	-0.035(0.64)	-0.106(0.47)	-0.025(0.66)	0.003(0.97)	-0.106(0.47)
	Streptococcus lactarius	-0.13(0.17)	-0.193(0.15)	-0.116(0.49)	-0.094(0.26)	-0.097(0.35)	-0.116(0.49)
	Streptococcus parasanguinis	-0.085(0.27)	-0.099(0.3)	-0.107(0.52)	-0.07(0.31)	-0.06(0.47)	-0.107(0.52)
	Streptococcus mitis	-0.077(0.22)	-0.105(0.19)	-0.063(0.63)	-0.055(0.36)	-0.054(0.46)	-0.063(0.63)
	Corynebacterium ulcerans	0.061(0.33)	0.076(0.31)	-0.034(0.88)	0.038(0.53)	0.018(0.79)	-0.034(0.88)

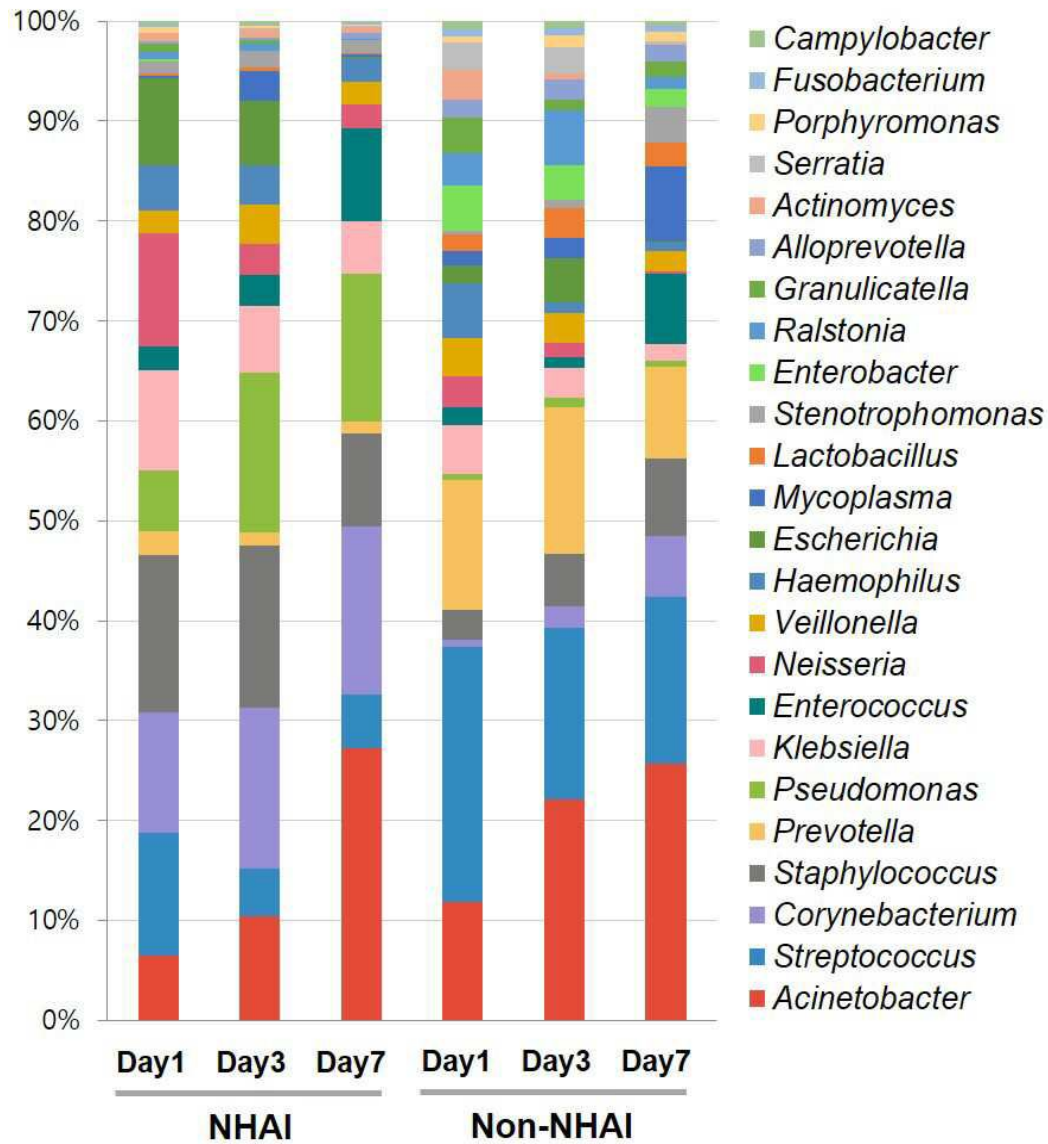
[0124]

도면

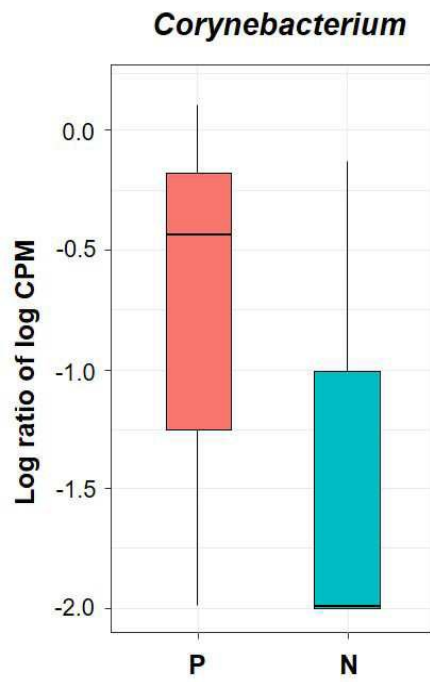
도면1a



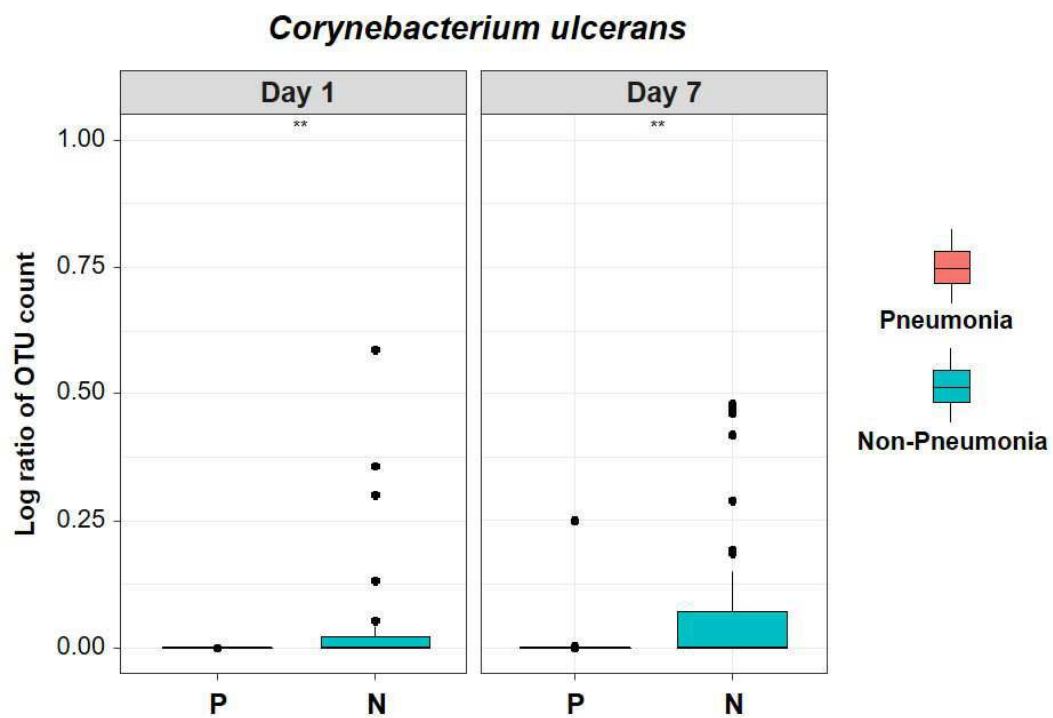
도면1b



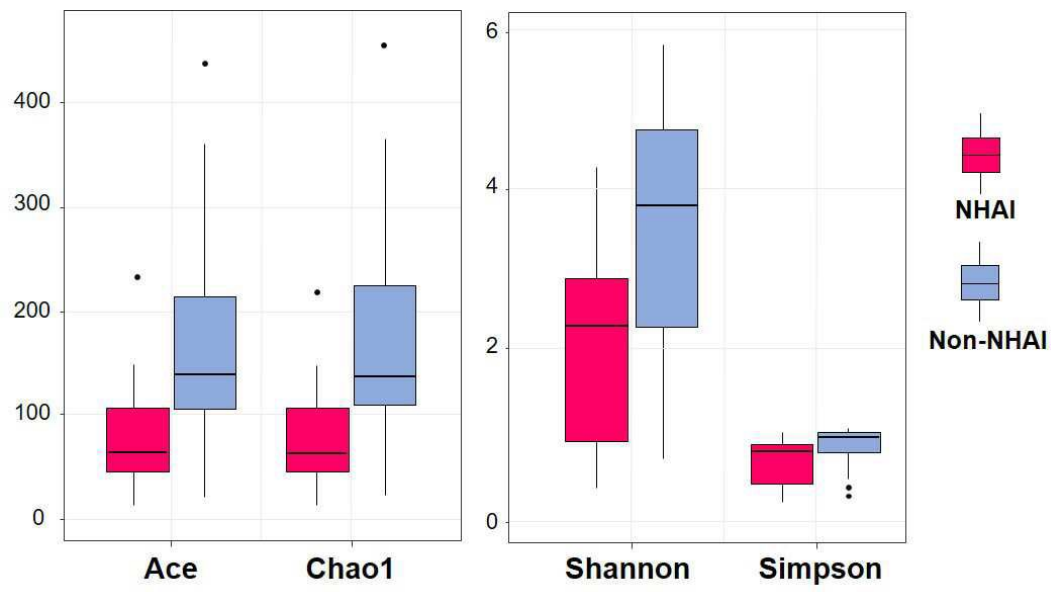
도면2a



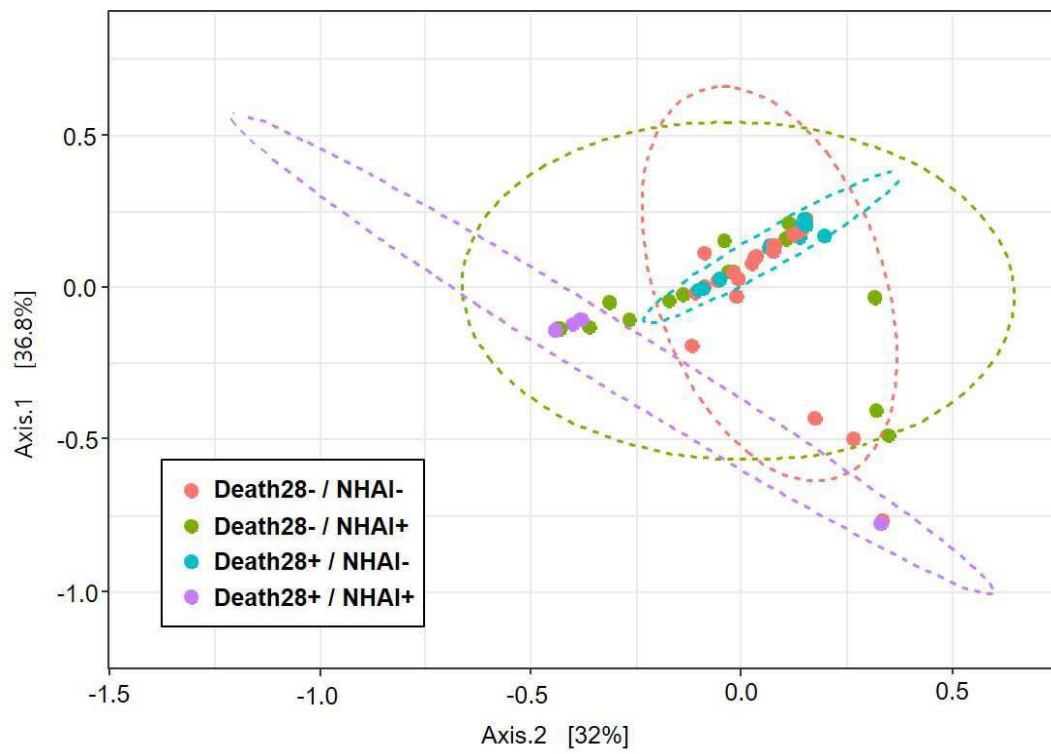
도면2b



도면3a



도면3b



도면4

