



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0107412
(43) 공개일자 2021년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G16H 50/50 (2018.01) G16C 20/30 (2019.01)

G16C 20/60 (2019.01) G16H 70/60 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G16H 50/50 (2018.01)

G16C 20/30 (2019.02)

(21) 출원번호 10-2020-0022382

(22) 출원일자 2020년02월24일

심사청구일자 2020년02월24일

(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

이재준

강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증의학과

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 12 항

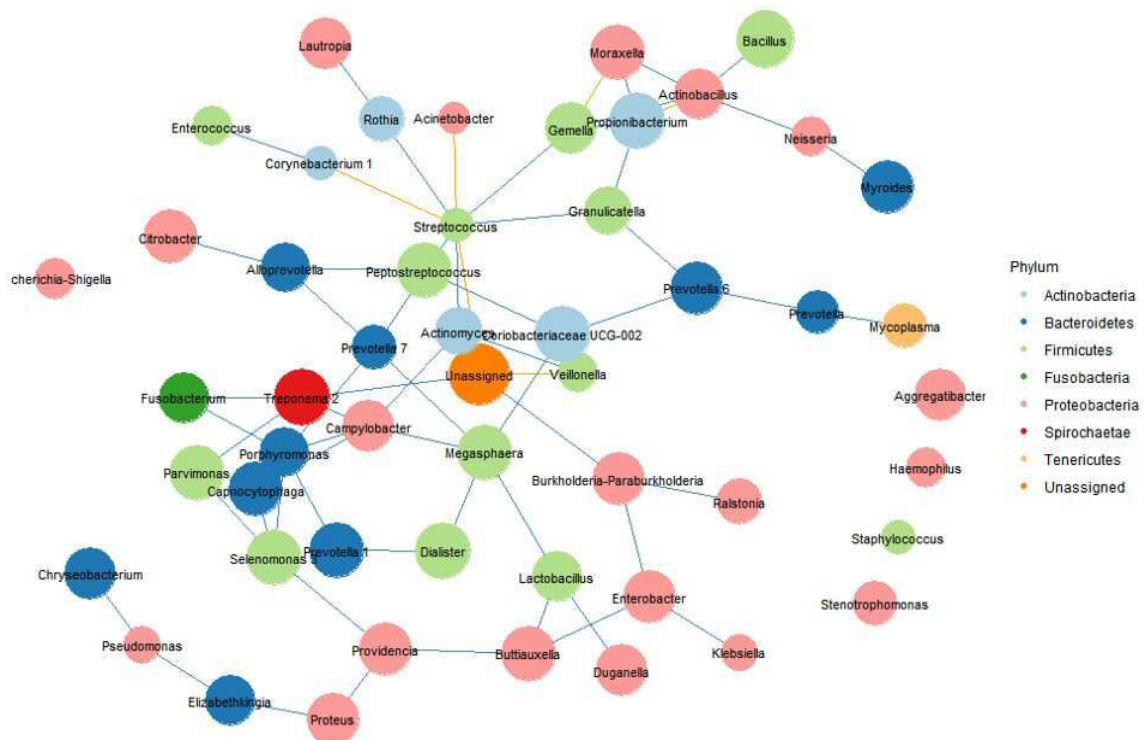
(54) 발명의 명칭 기계식 인공호흡 환자의 미생물 프로파일링으로 탈관 성공률과 28일 생존율을 예측하는 방법

(57) 요약

세균성 폐렴은 중환자실에서 기계적 인공호흡의 주요 원인이다. 우리는 삽관 과정 동안 기관 내 흡인물에서 특정 미생물군의 존재가 삽관 실패 또는 28일 사망률과 같은 임상 결과와 관련이 있다고 가정하였다. 60명의 기계적 인공호흡을 받는 중환자실 환자 (폐렴 환자 41명 및 비폐렴 환자 19명)를 대상으로 1일, 3일 및 7일에 기관 내

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



흡인물 216개를 얻었다. 22명의 환자가 3주 내에 성공적으로 탈관하였고 12명의 환자가 28일 이내에 사망했다. 미생물군 프로파일은 폐렴군과 비폐렴군 사이에서 상당히 달랐다 (Adonis, $P < 0.01$). 탈관 성공군에서 α -다양성 (새넨 지수)이 1일과 7일 사이에 현저하게 감소한 반면, 폐렴에 걸린 삽관 환자들 중 탈관 실패군에서는 감소하지 않았다. Bray-Curtis 거리에서 탈관 성공군과 탈관 실패군 간에는 α -다양성 변화에 유의한 차이가 있었다 ($P < 0.001$). 로티아, 스트렙토코커스 및 프리보텔라는 속 수준에서 α -다양성의 변화와 상관관계가 있었다. 삽관 당시 스트렙토코커스의 상대적 풍부도는 28일 사망률과 밀접한 관련이 있었다. 호흡기 미생물군의 역학은 탈관 실패 및 사망과 같은 임상 결과와 관련이 있다.

(52) CPC특허분류

G16C 20/60 (2019.02)

G16H 70/60 (2021.08)

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	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2017.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 시료를 채취하고, 시료 내의 스트렙토코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 1종 이상의 상대적 풍부도를 조사하여 상대적 풍부도가 평균보다 높은 경우 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율 중 하나 이상이 높은 것으로 판단하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법.

청구항 2

기계식 삽관 인공호흡 환자의 기관 내에서 얻은 시료에서 삽관 1~7일 내에 구강 분류군의 풍부도를 조사하여 구강 분류군이 평균에 비해 풍부한 경우 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율이 높은 것으로 판단하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 구강 분류군이 평균에 비해 풍부한 경우 폐 상피 손상 및 폐 염증이 덜 발생하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 구강 분류군은 스트렙토코커스, 액티노마이세스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라, 로티아 및 프리보텔라 중 선택된 1종 이상인, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 구강 분류군은 스트렙토코커스, 로티아 및 프리보텔라 중 1종 이상인, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법.

청구항 6

기계식 삽관 인공호흡 환자의 기관 내에 구강 분류군을 투여하여 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 구강 분류군은 스트렙토코커스, 액티노마이세스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라, 로티아 및 프리보텔라 중 선택된 1종 이상인, 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 구강 분류군은 베일로넬라인, 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법.

청구항 9

기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 폐암 여부를 확인하는 바이오마커로서, 슈도모나스, 코리넨오박테리움 1, 베일로넬라, 로티아, 엔테로코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 선택된 1종의 폐암 바이오마커.

청구항 10

기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 폐암 여부를 확인하는 바이오마커로서, 스트렙토코커스, 프리보텔라, 알로프리보텔라, 미코플라즈마 및 그래놀리카텔라 중 선택된 1종의 비폐암 바이오마커.

청구항 11

기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 높은 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율을 예측하는, 스트렙토코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 선택된 1종 이상의 바이오마커.

청구항 12

기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 낮은 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율을 예측하는, 알로프리보텔라 및 엔테로코커스 중 선택된 1종 이상의 바이오마커.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 삽관한 기계식 인공호흡 환자에서 채취한 시료로부터 미생물을 프로파일링하여 특정 미생물의 풍부도에 따라 탈관 성공률 및/또는 28일 생존율을 효율적으로 정확히 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐렴은 입원 및 사망의 주요 원인이며 미국 성인의 상당한 의료비와 관련이 있다 (1, 2). 폐렴을 앓는 고령 환자의 중환자실 (ICU) 입원은 상당한 비용증가 없이 생존율을 향상시키는 방법과 관련이 있다 (3). 가장 최근의 지침에 따르면 호흡기 배양에 기초하여 항생제 요법을 조정해야 한다 (4). 그러나 배양 기반 분석은 감도가 낮고 처리 시간이 길다 (2). 또한, 폐렴 환자의 30-78%에서 박테리아 병원균이 분리되지 않는다 (2, 5, 6). 환자 시료에서 미생물 DNA의 차세대 서열분석은 배양 기반 진단의 한계를 극복할 것으로 예상된다. 16S rRNA 유전자의 서열분석은 혐기성 미생물 및 까다로운 유기체의 동정을 가능하게 한다.

[0004] 기계식 인공호흡은 호흡기 미생물의 장내세균 불균형(dysbiosis)과 관련이 있으며, 호흡기 미생물군 마커로부터 중환자실 환자의 인공호흡기 관련 폐렴 발병 또는 사망률을 예측할 수 있다 (7-9). 임상 결과 또는 숙주 반응과의 연관성에 대한 호흡기 미생물군의 영향 조사는 현재의 배양 기반 실무를 대체할 새로운 미생물 표적 치료제의 개발을 유도할 수 있다 (10). 또한, 중환자실 환자의 폐렴 진단을 위한 차세대 서열분석 기술이 연구 중에 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

- (비특허문헌 0001) Xu J et al, Natl Vital Stat Rep. 2018;67(5):1-76.
- (비특허문헌 0002) Jain S et al, N Engl J Med. 2015;373(5):415-27.
- (비특허문헌 0003) Valley TS et al, JAMA 2015;314(12):1272-9.
- (비특허문헌 0004) Kalil AC et al, Clin Infect Dis. 2016;63(5):575-82.
- (비특허문헌 0005) Esperatti M et al, Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(12):1533-9.
- (비특허문헌 0006) Kitsios GD et al, Front Microbiol. 2018;9:1413.
- (비특허문헌 0007) Zakharkina T et al, Thorax. 2017;72(9):803-10.
- (비특허문헌 0008) Emonet S et al, Intensive Care Med. 2019;45(8):1082-92.
- (비특허문헌 0009) Lamarche D et al, Respir Res. 2018;19(1):245.
- (비특허문헌 0010) Kitsios GD et al, J Crit Care. 2017;38:84-91.
- (비특허문헌 0011) Segal LN et al, Microbiome. 2013;1(1):19.
- (비특허문헌 0012) Segata N et al, Genome Biol. 2011;12(6):R60.
- (비특허문헌 0013) Csardi G et al, InterJ Complex Syst. 2006;1695(5):1-9.
- (비특허문헌 0014) Jalili M et al, PLoS One. 2015;10(11):e0143111.
- (비특허문헌 0015) Asshauer KP et al, Bioinformatics. 2015;31(17):2882-4.
- (비특허문헌 0016) Kelly BJ et al, Microbiome. 2016;4:7.
- (비특허문헌 0017) de Steenhuijsen Piers WA et al, ISME J. 2016;10(1):97-108.
- (비특허문헌 0018) Kitsios GD et al, Am J Respir Crit Care Med. 2018;198(3):294-7.
- (비특허문헌 0019) Ramanan P et al, J Clin Microbiol. 2014;52(9):3184-9.
- (비특허문헌 0020) Laufer AS et al, mBio. 2011;2(1):e00245-10.
- (비특허문헌 0021) Bousbia S et al, PLoS One. 2012;7(2):e32486.
- (비특허문헌 0022) Segal LN et al, Nat Microbiol. 2016;1:16031.
- (비특허문헌 0023) Leitao Filho FS et al, Am J Respir Crit Care Med. 2019;199(10):1205-13.
- (비특허문헌 0024) Wang Z et al, Thorax. 2018;73(4):331-8.
- (비특허문헌 0025) Molyneaux PL et al, Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(10):1224-31.
- (비특허문헌 0026) Ferreira DM et al, Am J Respir Crit Care Med. 2013;187(8):855-64.
- (비특허문헌 0027) Brown JS. Am J Respir Crit Care Med. 2020;201(3):268-70.
- (비특허문헌 0028) Mitsi E et al, Am J Respir Crit Care Med. 2020;201(3):335-47.
- (비특허문헌 0029) Camberlein E et al, Infect Immun. 2015;83(3):1181-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 시료 중 호흡기 미생물군을 프로파일링하여 탈관 성공 가능성 및/또는 28일 생존율을 좀 더 효과적이고 정확하게 예측하는 방법을 제공하려는 것이다.
- [0008] 본 발명자들은 기계 인공호흡 중 호흡기 박테리아 미생물군의 구성으로부터 폐렴에 걸린 삽관 환자의 임상 결과 (삽관 실패 및 28일 사망률)를 예측할 수 있을 것이라는 가설을 세운 후 16S rRNA 서열분석을 수행하여 기계식 인공호흡 환자의 기관 내 흡인물 (ETA)에서 미생물군의 변화를 평가했다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자들은 중환자실에 입원할 때 기계식 인공호흡을 실시한 삽관 환자의 호흡기 미생물군에서의 종방향 변화를 평가했다. 수 개의 군이 삽관 환자의 호흡기 미생물군의 대부분을 차지하여 이전 보고서 (6, 9, 16)와 일치하는 결과를 나타내었다. 16S rRNA 서열분석은 음성 배양 결과를 나타낸 환자에서 비정형 유기체의 식별을 가능하게 했다. 또한, 폐렴에 걸린 기계식 인공호흡 환자는 폐렴에 걸리지 않은 환자보다 α -다양성이 낮은 경향이 있었다. 박테리아의 α -다양성은 이전에 보고된 바와 같이 기계적 인공호흡 동안 감소하는 경향이 있었지만, 이 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 (8, 16).
- [0011] β - 다양성 (Bray-Curtis 비유사성)은 폐렴군과 비폐렴군 간에 유의하게 달랐다 (도 1). 비폐렴 삽관 환자와 비교하여 폐렴 삽관 환자에서 슈도모나스, 코리네박테리움 및 로티아의 풍부도가 증가하는 반면 스트렙토코커스 및 프리보텔라의 풍부도는 감소함을 발견했다. 미세 흡인을 유발하는 구강 분류군 (17, 18) 중에서 로티아 (*Rothia*), 베일로넬라 (*Veillonella*) 및 나이세리아 (*Neisseria*)는 폐렴과 관련이 있었지만 프리보텔라와 스트렙토코커스는 폐렴과 관련이 없었다. Ramnanan 등과 Laufer 등은 호흡기 감염의 병인에서 로티아의 역할을 제안했다 (19, 20). 프리보텔라는 병원내 폐렴 (nosocomial pneumonia)의 위험 감소와 관련이 있다 (21).
- [0012] 중요한 것은 미생물군으로부터 기계적 인공호흡 중환자의 임상 결과를 예측할 수 있다는 점이다. 1일째에 스트렙토코커스 및 헤모필러스와 같은 일부 분류군의 상대적 풍부도는 탈관 실패군보다 탈관 성공군에서 유의하게 높았다. 우리는 3주 이내에 탈관 실패와 같은 임상 결과에 따라 호흡기 미생물군의 구성에 차이가 있음을 발견했다. 탈관 성공군은 β -다양성의 변화를 보여주었으나, 탈관 실패군은 그렇지 않았다. β -다양성의 종방향 변화와 임상 결과 사이의 이러한 연관성은 숙주-마이크로바이옴 상호작용으로 인한 것일 수 있다. 로티아, 프리보텔라 및 스트렙토코커스와 같은 구강 분류군은 β -다양성의 변화와 관련이 있다. 이 발견은 일부 구강 분류군이 삽관 폐렴 환자의 임상 결과에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.
- [0013] 삽관 폐렴 환자의 네트워크 분석에 따르면 구강 분류군 (예컨대 스트렙토코커스, 액티노마이세스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라 및 프리보텔라)의 풍부도와 상관관계가 있음이 밝혀졌다. 여러 연구에서 호흡기 미생물군 내의 구강 분류군을 평가했다 (17, 22). Segal 등은 흡인 유래 구강 미생물군이 건강한 개인의 기저 점막 Th17 면역 활성화를 조절한다고 보고했다 (22). Pitsers 등은 상부 호흡 기관에서 미생물의 상대적 풍부도에 기초한 모델이 폐렴 환자와 건강한 개인을 구별할 수 있다고 보고했다 (17).
- [0014] 구강 분류군과 폐렴 사이의 연관성은 구강 분류군이 병원성 분류군과 비교하여 약한 면역 반응과 관련이 있다는 개념과 일치한다. 기계 인공호흡 환자 연구 (6)에서 Kitsiois 등은 배양 음성 호흡기 시료의 80%가 구강 세균이 풍부하여 폐 상피 손상 및 염증이 덜 발생한다는 것을 발견했다. 따라서, 감염으로 인해 기저 호흡기 미생물이 억제된 삽관 환자에서 구강 분류군의 상대적 풍부함은 숙주 반응 및 임상 결과에 영향을 줄 수 있다.
- [0015] 객담 마이크로바이옴의 특정 분류군과 만성 폐쇄성 폐질환 환자의 사망률 위험도 증가 사이에는 연관성이 있을 수 있다 (23-25). 구강 베일로넬라 속의 풍부도는 1년 이내에 사망한 환자뿐만 아니라 만성 폐쇄성 폐질환이 급격히 악화되는 동안에도 현저히 감소하였다.
- [0016] 16S rRNA 서열분석 데이터는 삽관시 더 적은 양의 스트렙토코커스가 28일 사망률과 관련이 있음을 보여 주었다. 이 결과는 최근의 발견과 함께 폐 면역 반응에서 스트렙토코커스 뉴모니아의 역할을 강조한다 (26, 27). 실제로, 스트렙토코커스 뉴모니아 콜로니화는 폐포 대식세포의 포식 능력을 증가시키는 것으로 보고되었다 (27-29). Mitsi 등은 *S. pneumoniae*의 폐내 잔존과 관련된 폐 면역의 개선과 관련된 기작이 항원-자극 Th1 활성화에 의한 적응 면역의 발현 또는 개선된 식균작용으로 폐포 대식세포의 후성적 변화를 구성할 수 있다고 가정했다 (28). 호흡기의 박테리아 콜로니화와 숙주 면역 반응 사이의 상호 작용의 명확화는 기계적 인공호흡을 필요로 하는 심각한 폐렴의 예측 및 예방을 위한 새로운 전략으로 이어질 수 있다. 또한, 분류-유도된 메타게놈 데이터는 임상 결과, 면역 상태 및 미생물 대사 사이의 연관성을 나타낼 수 있다.

- [0017] 요약하면, 본 발명자들은 폐렴 삽관 환자에서 하부 호흡 기관 미생물군의 구성과 다양성을 발견했다. 중요한 점은 본 발명자들이 탈관 성공군 환자에서 호흡기 마이크로바이옴 β -다양성의 중대한 종방향 변화를 발견하였다는 것이다. 이 중대한 종방향 변화는 로티아, 스트렙토코커스 및 프리보텔라의 상대적 풍부도와 양의 상관관계가 있었다. 메타분류학적 분석에 따르면 삽관시 스트렙토코커스의 낮은 풍부도는 28일 사망률과 관련이 있는 것으로 보인다.
- [0019] 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 시료를 채취하고, 시료 내의 스트렙토코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 1종 이상의 상대적 풍부도를 조사하여 상대적 풍부도가 평균보다 높은 경우 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율 중 하나 이상이 높은 것으로 판단하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자로부터 얻은 시료에서 삽관 1~7일 내에 구강 분류군의 풍부도를 조사하여 구강 분류군이 평균에 비해 풍부한 경우 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율이 높은 것으로 판단하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 구강 분류군이 평균에 비해 풍부한 경우 폐 상피 손상 및 폐 염증이 덜 발생하는 것을 특징으로 하는, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 구강 분류군이 스트렙토코커스, 액티노마이세스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라, 로티아 및 프리보텔라 중 선택된 1종 이상인, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 구강 분류군이 스트렙토코커스, 로티아 및 프리보텔라 중 1종 이상인, 삽관 인공호흡 환자의 미생물군으로부터 탈관 성공을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자에게 구강 분류군을 투여하여 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 구강 분류군이 스트렙토코커스, 액티노마이세스, 베일로넬라, 그레놀리카텔라, 로티아 및 프리보텔라 중 선택된 1종 이상인, 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 구강 분류군이 베일로넬라인, 탈관 성공률 및 28일 생존율 중 하나 이상을 높이는 방법에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 폐암 여부를 확인하는 바이오마커로서, 슈도모나스, 코리넨오박테리움 1, 베일로넬라, 로티아, 엔테로코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 선택된 1종의 폐암 바이오마커에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 폐암 여부를 확인하는 바이오마커로서, 스트렙토코커스, 프리보텔라, 알로프리보텔라, 미코플라즈마 및 그레놀리카텔라 중 선택된 1종의 비폐암 바이오마커에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 높은 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율을 예측하는, 스트렙토코커스, 나이세리아 및 헤모필러스 중 선택된 1종 이상의 바이오마커에 관한 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명은 기계식 삽관 인공호흡 환자의 삽관시 또는 삽관 1일째에 기관 내에서 채취한 시료로부터 낮은 탈관 성공 가능성 및 28일 생존율을 예측하는, 알로프리보텔라 및 엔테로코커스 중 선택된 1종 이상의 바이오마커에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 따르면 삽관 인공호흡 환자로부터 채취한 기관 내 시료의 미생물군을 조사하여 이로부터 탈관 성공 가능성 및/또는 28일 생존율을 쉽고 정확하게 예측할 수 있으며, 이와 같은 미생물군을 이용하여 탈관 성공 가능성 및/또는 28일 생존율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1. 호흡기 미생물군은 폐렴이 있는 삽관 환자와 폐렴이 없는 삽관 환자간에 차이가 있었다. (a) 문 및 속 수준에서 하부 호흡기 미생물군 구성. (b) 새년 다양성 지수 및 심슨 지수. 적색: 폐렴군, 청색: 비폐렴군. (c) PCoA 2차원 맵으로 도시된 호흡기 미생물군의 브레이-커티스 거리. 각 점은 하나의 시료를 나타낸다. (d) LDA 효과 크기 (> 2.5 배)에 기초하여 검출된 독특한 바이오마커 박테리아의 히스토그램.
- 도 2. 폐렴에 걸린 삽관 환자의 호흡기 미생물군은 탈관 성공군 (1군)과 탈관 실패군 (2군)간에 차이가 있었다. (a) 새년 다양성 지수 및 심슨 지수. (b) PCoA 2차원 지도로 표시된 호흡기 미생물군의 브레이-커티스 거리. 각 점은 하나의 시료를 나타낸다. (c) LDA 효과 크기 (> 2.5 배)에 기초하여 검출된 독특한 바이오마커 박테리아의 히스토그램.
- 도 3. 폐렴에 걸린 삽관 환자에서 호흡기 미생물군의 종방향 변화. (a) 기계적 인공호흡이 시작된 후 1일에서 7일 사이의 α -다양성의 변화. 새년 다양성 지수와 심슨 지수는 α -다양성의 척도이다. 왼쪽: 탈관 성공군 (1군); 오른쪽: 탈관 실패군 (2군). (b) 호흡기 미생물군의 브레이-커티스 거리의 PCoA 플롯. 각 색상은 날짜를 나타낸다. 왼쪽, 탈관 성공군 (1군); 오른쪽, 탈관 실패군 (2군). (c) 브레이-커티스 거리의 변화는 탈관 성공군의 경우 빨간색 점선으로 표시되고 탈관 실패군의 경우 파란색 점선으로 표시된다. 검은색과 회색 화살표는 두 시점 간의 탈관 성공군 및 탈관 실패군의 평균 변화를 나타낸다. 로지스틱 회귀 분석은 PCo2의 변화가 두 군 사이에서 유의하게 다르다는 것을 보여 주었다 ($P = 0.001$).
- 도 4. 53개의 마디와 60개의 모서리로 구성된 폐렴 삽관 환자의 미생물 네트워크. 모서리는 양방향성을 갖는 FDR q -값 < 0.05 와의 연관성을 보여준다. 각 모서리는 OTU 간의 현저한 상관관계를 나타낸다. 청색, $n =$ 양의 상관관계; 황색, $n =$ 음의 상관관계.
- 도 5. 폐렴 삽관 환자에서 호흡기 미생물군과 28일 사망률의 관계. (a) 새년 다양성 지수 및 심슨 지수. (b) PCoA 2차원 지도로 표시된 시료간 브레이-커티스 거리. 각 점은 하나의 시료를 나타낸다. (c) LDA 효과 크기 (> 2.5 배)에 기초하여 검출된 독특한 바이오마커 박테리아의 히스토그램. (d) 28일 생존율과 1일차 ETA에서 스트렙토코커스의 상대적 풍부도 사이의 연관성에 대한 ROC 곡선. LDA, 선형 식별 분석 (linear discriminating analysis); ROC, receiver operating characteristics; ETA, 기관 내 흡인물 (endotracheal aspirate).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 아래에서는 본 발명의 구성을 구체적인 실험에 또는 실시예를 들어 좀 더 자세히 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 실시예 또는 실험예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0037] 연구 디자인

- [0038] 이 연구는 한국 춘천성심병원 중환자실에서 시행되었다. 참가자는 폐렴에 걸린 41명의 환자와 폐렴에 걸리지 않은 19명의 환자로 구성되었다. 환자는 2017년 7월부터 2018년 8월까지 중환자실 입원 당시 기계식 인공호흡을 받았고 장기적으로 추적 조사를 받았다. 배제 기준은 다음과 같다: 1) 18세 미만; 2) 중환자실 입원 후 48시간 이후 기계적 호흡 개시; 3) 근위축성 측삭 경화증과 같은 신경 근육 질환의 존재; 4) 사전 동의를 제공할 수 없는 경우; 및 5) 기계적 호흡 기간 7일 미만. 폐렴 진단은 국제 가이드라인을 기반으로 했다. 인구 통계학적 변수, 동반 질환, 삽관 적응증 및 질병의 중증도 (APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) 점수 및 SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) 점수)를 포함한 임상 데이터가 기록되었다. 임상 결과에는 3주간의 기계적 호흡과 28일 사망률의 이유가 포함되었다.

- [0039] 모든 환자 또는 대리인으로부터 사전 동의를 얻었다. 이 연구 프로토콜은 춘천 성심병원 임상시험 심사위원회에 의해 승인되었다 (IRB 승인번호: 2017-47).

[0041] DNA 추출, PCR 및 파이로시퀀싱

- [0042] 기관 내 흡인으로 시료를 채취하였다. 기계적 호흡이 시작된 후 24시간 이내에 초기 시료를 수집하였다. 그 후

3일 및 7일에 순차적으로 시료를 수집하였다. 시판 미생물 DNA 분리 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 200 μ L의 235 개 기관 내 흡인물 (ETA) 시료로부터 총 DNA를 추출하였다.

[0043] 추출된 DNA를 원핵생물 16S rRNA 유전자의 V3 내지 V4 영역을 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 프라이머는 16S_V3_F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGAT

[0044] GTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') 및 16S_V4_R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')이다. 증폭은 다음과 같이 수행하였다: 95℃에서 3분 (변성); 94℃에서 30초 (변성), 58℃에서 30초 (어닐링), 72℃에서 30초 (연장)을 21회 반복; 72℃에서 3분 (최종 연장). 연장 산물은 MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 정량 및 서열분석 하였다.

[0046] 데이터 가공

[0047] 인텍스 서열을 사용하여 다른 시료들을 분류하여 MiSeq 원시 데이터의 FASTQ 파일을 생성했다. 어댑터 서열을 제거하고 SeqPurge를 사용하여 오류를 수정했다. MiSeq 시스템에서 얻은 Paired-end reads는 FLASH 소프트웨어를 사용하여 병합되었다. 400 bp 미만의 병합된 서열이 제거되었다. 서열분석 오류 (즉, 저품질, 모호한 서열 및 키메라 서열)는 CD-HIT-OUT을 사용하여 교정하였다. OTU (Operational taxonomic units)는 97% 이상의 유사한 서열을 클러스터링함으로써 형성되었다. 분류학적 할당은 가장 유사한 종에 대한 정보를 이용하여 국립 생명공학정보 16S 미생물 데이터베이스를 참고자료로 하는 BLASTN (2.4.0 버전)을 사용하여 수행되었다. 데이터베이스와 일치하는 최고 적중 쿼리 범위가 85% 미만이고 일치 영역이 85% 미만인 경우 분류 체계가 정의되지 않았다. 시료당 평균 122,818개의 관독값을 얻었으며 (최소, 4; 최대, 587,337), 적은 수의 관독값 (<2500)을 가진 19개의 시료는 품질 관리를 위해 여과했다. 최종적으로 216개의 시료를 분석했다.

[0049] 통계 분석

[0050] 생물 다양성과 공동체 유사성 분석은 MD healthcare (서울, 한국)를 사용하여 수행되었다. 미생물 생태계 비교는 Quantitative Insights in Microbial Ecology 소프트웨어 (QIIME) (v. 1.8) 및 R 패키지 Vegan (11)를 사용하여 수행하였다. 유의미한 연관성을 검정하기 위해 Mann-Whitney U 검정을 연속 변수에 사용하고 카이 제곱 검정을 범주형 변수에 사용했다. 미생물군의 α -다양성은 새년 다양성 지수 및 심슨 지수를 계산하여 측정하였다. β -다양성 지수는 공유 구조의 정도에 기초하여 미생물군 사이의 유사성 정도로서 정의되었다. 주좌표 분석 (principal coordinates analysis; PCoA)은 박테리아 속의 제곱근 변환된 상대적 풍부도의 브레이 커티스 유사성 매트릭스에 기초하였다. 군간 차이를 확인하기 위해 Adonis 테스트를 수행했으며 로지스틱 회귀 분석을 사용하여 두 군 간의 주좌표 변경의 차이를 평가했다.

[0051] 선형 판별분석 효과 크기 (Linear discriminant analysis effect size; LEfSe)를 사용하여 박테리아 분류군의 상대적 풍부도를 결정함으로써 독특한 바이오마커를 검출하였다. LDA (Linear Discriminant Analysis) 점수 > 2.5는 군 사이에서 유의하게 구별되는 특징을 식별하는 데 사용되었다 (12). R에 대한 Igraph (13) 및 centiserve (14) 패키지를 사용하여 삼관 환자의 폐 미생물군 커뮤니티 내 상호 작용을 분석했다. Tax4Fun 소프트웨어 (15)를 사용하여 예측 기능 분석을 수행했다. 미생물 군집의 기능적 능력은 16S rRNA 유전자 서열을 맵핑하고 유전자 및 게놈 교토 백과사전에 기초한 기능적 주석 달기를 수행함으로써 예측되었다. 미생물 바이오마커의 성능을 평가하기 위해 ROC 곡선을 생성하였다. 통계 분석은 Windows 10용 R 버전 3.4.4로 수행되었으며; P-값 <0.05은 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

[0053] 결과

[0054] 연구 대상 집단의 특성

[0055] 이 연구에서는 폐렴에 걸린 41명의 환자와 폐렴에 걸리지 않은 19명 환자의 시료를 분석했다. 총 216개의 시료를 16S rRNA 서열분석으로 분석하여 30,236,835개의 서열 (중간값, 123,541; 사분위수 범위, 시료당 97,015-156,914개의 서열)을 산출하였다. 216개 시료에서 2883개의 OTU가 검출되어 37개의 문과 1085개의 속으로 분류되었으며, 연구 대상 집단의 기본 특성은 표 1에 나열되어 있다.

[0056] 폐렴군 및 비폐렴군은 연령, 성별, 찰슨 동반질환지수 또는 중증지수 (APACHE 및 SOFA 점수)에서 차이가 없었다. 급성 호흡 곤란 증후군 환자의 비율과 삽관의 원인은 두 군에서 유의하게 달랐다. 폐렴으로 인해 기계식 인공호흡을 받은 환자는 임상 결과에 따라 3주 이내에 탈관에 성공한 군 또는 실패한 군의 두 군으로 분류되었다. 탈관 성공군 및 탈관 실패군은 연령, 성별 및 찰슨 동반질환지수 면에서 유사했다. 탈관 실패군에서 탈관 성공군보다 중증지수와 사망률이 더 높았다.

표 1

	Pneumonia Group		Non-pneumonia Group	P value [†]	P value [‡]
	Successful extubation	Failed extubation			
	n = 22	n = 19	n = 19		
Age [¶]	72 (58-75)	76 (70-85)	76 (59-81)	0.738	0.063
Male sex [¶]	16 (72.7%)	14 (73.7%)	12 (63.2)	0.547	0.99
Acute respiratory distress syndrome [†]	2(9.1%)	6 (31.6%)	0 (0%)	0.047	0.115
Charlson comorbidity index [¶]	2(0.8-3.3)	3(2-5)	2(1-2)	0.051	0.227
Cause of intubation [†]				<0.001	0.269
Cardiac arrest	0 (0.0%)	1 (5.3%)	3 (15.8%)		
Neurological distress	4 (18.2%)	1 (5.3%)	14 (73.7%)		
Postoperative status	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.3%)		
Respiratory	18 (81.8%)	17 (89.5%)	1 (5.3%)		
PaO ₂ /FiO ₂	241 (137-325)	188 (102-292)	430 (321, 457)		0.14
Severity [¶]					
APACHE score	17 (15-21.5)	23(19-25)	22 (17-25)	0.165	0.015
SOFA score	7(5-8.3)	8(7-13)	6 (4-9)	0.227	0.045
GCS [¶]	8(6.8-10)	9(5-11)	6 (5-9)	0.074	0.895
28-day mortality [†]	0 (0%)	12 (63.2%)	6 (31.6%)	>0.99	<0.001
ICU mortality [†]	0 (0%)	17 (89.5%)	6 (31.6%)	0.4	<0.001
MV duration [¶]	8 (7-14)	16 (13-25)	10 (7-14)	0.238	<0.001
CRP (mg/dL) [¶]	139 (65.8-221.3)	133 (44-158)	61 (4.6-132.1)	0.011	0.488

[¶] Median (interquartile range), [†] frequency (%)
[†] Pneumonia vs. non-pneumonia group.
[‡] Successful extubation vs. failed extubation group (limited to patients with pneumonia).
 PaO₂/FiO₂, ratio of arterial oxygen partial pressure to fractional inspired oxygen; APACHE II: Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; GCS, Glasgow coma scale; ICU, intensive care unit; MV, mechanical ventilation; CRP, C-reactive protein

[0057]

[0059] 삽관 환자의 1일차 기관 내 흡인물 미생물군 구성

[0060] 우세한 세균 문은 프로테오박테리아 (*Proteobacteria*)와 퍼미큐티스 (*Firmicutes*)였다 (도 1A). 전체적으로, 관독한 미생물군의 77%가 이들 중 하나에 속했다 (폐렴 78%; 폐렴이 아닌 경우 76%). 우세한 속은 총 DNA 서열의 0.5%를 초과하는 속으로 정의되었고, 20개의 지배적인 속이 탐지되었다.

[0061] 새넨 지수 ($P = 0.24$) 및 심슨 지수 ($P = 0.37$)로 나타낸 바와 같이, 폐렴군 및 비폐렴군에서 종 풍부도는 유사하였다. PCoA에 의해 결정된 β -다양성은 두 군 사이에서 상당히 달랐다 (도 1B, Adonis $P = 0.001$). LEfSe 분석은 14가지의 구별되는 분류군을 보여 주었다. 속 수준에서 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 베일로넬라 (*Veillonella*), 로티아 (*Rothia*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*) 및 니세리아 (*Neisseria*)는 폐렴군에서 우세했다. 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 프리보텔라 (*Prevotella*), 알로프리보텔라 (*Alloprevotella*), 그라눌리카텔라 (*Granulicatella*) 및 미코플라즈마 (*Mycoplasma*)는 비폐렴군에서 우세했다.

[0062] 폐렴 환자에서 α -다양성은 탈관 성공군과 탈관 실패군 간에 차이가 없었다. 1일차에 β -다양성은 두 군 간에 상이하였다 ($R^2 = 0.0408$, $P = 0.021$). 폐렴 환자 중 박테로이데테스 (*Bacteroidetes*)는 탈관 실패군보다 탈관 성공군에서 훨씬 더 풍부했다 (탈관 성공군 8.5% 대 탈관 실패군 6.7%). 속 수준에서, LEfSe 분석은 탈관 실패군에 비해 탈관 성공군에서 헤모필러스 (*Hemophilus*) 및 스트렙토코커스 (*Streptococcus*)의 상대적 풍부도가 현저히 높았고 엔테로코커스 (*Enterococcus*)의 풍부도가 낮음을 나타내었다.

[0064] 폐렴 환자에서 기계적 인공호흡 중 호흡기 미생물의 변화

[0065] 시간에 따른 다양성의 변화는 탈관 성공군과 탈관 실패군 간에 달랐다 (도 3). 새넨 지수는 탈관 성공군에서 1일과 7일 사이에 현저히 감소했지만 탈관 실패군에서는 그렇지 않았다. 또한, 1일에서 7일 사이의 개체 내 브레이-커티스 비유사성은 탈관 성공군에서 유의하게 다르지만 탈관 실패군에서는 그렇지 않았다.

[0066] 탈관 성공군과 탈관 실패군 간에 PCo2의 변화에 유의한 차이가 있었다 (Adonis, $P = 0.001$). 로티아, 스트렙토코커스 및 프리보텔라의 풍부도는 PCo2의 변화와 양의 상관관계가 있었다.

[0067] 폐렴 삽관 환자의 폐 균집 내에서 생태학적 상호작용이 평가되었다 (도 4). 네트워크의 평균 클러스터링 계수는 0.11이고 평균 이웃 수는 2.85이며, 지름은 52이다. 폐렴 삽관 환자의 미생물 네트워크는 53개의 노드와 60개의 가장자리로 구성되었다. 스트렙토코커스는 아시네토박터 및 코리네박테리움과 음의 연관성을 보여주었다. 스트렙토코커스는 가장 높은 연결성을 가져, 로티아, 제멜라, 그레놀리카텔라, 프리보텔라 및 악티노마이세스와의 협력 전략을 나타내었다.

[0068] 예측된 기능적 프로파일링을 통해 탈관 성공군이 탈관 실패군에 비해 불일치 복구 및 상동 재조합과 관련된 박테리아 유전자의 비율이 더 큰 것으로 나타났다. 대조적으로, 탈관 실패군은 질소 대사 및 포르피린 및 엽록소 대사와 관련된 유전자의 비율이 더 높았다.

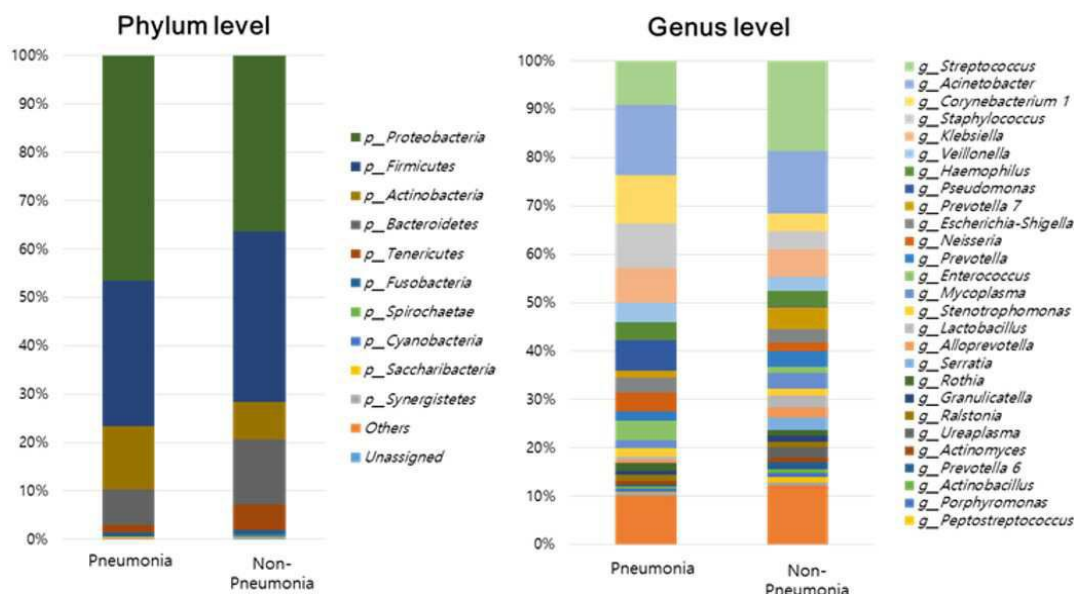
[0070] 호흡기 미생물군에 대한 28일 사망률의 영향

[0071] α -다양성은 28일 후 생존 환자와 죽은 환자 사이에서 차이가 없었지만, β -다양성은 1일째에 상이하였다 ($R^2 = 0.0436$, $P = 0.008$). 스트렙토코커스, 헤모필러스 및 나이세리아의 풍부함은 28일 생존군에서 강화되었다 (LDA 점수 > 2.5 , 도 5). 28일 사망군은 28일 생존군과 비교하여 코리네박테리움 및 알로프리보텔라의 상대적 풍부도가 더 높았다.

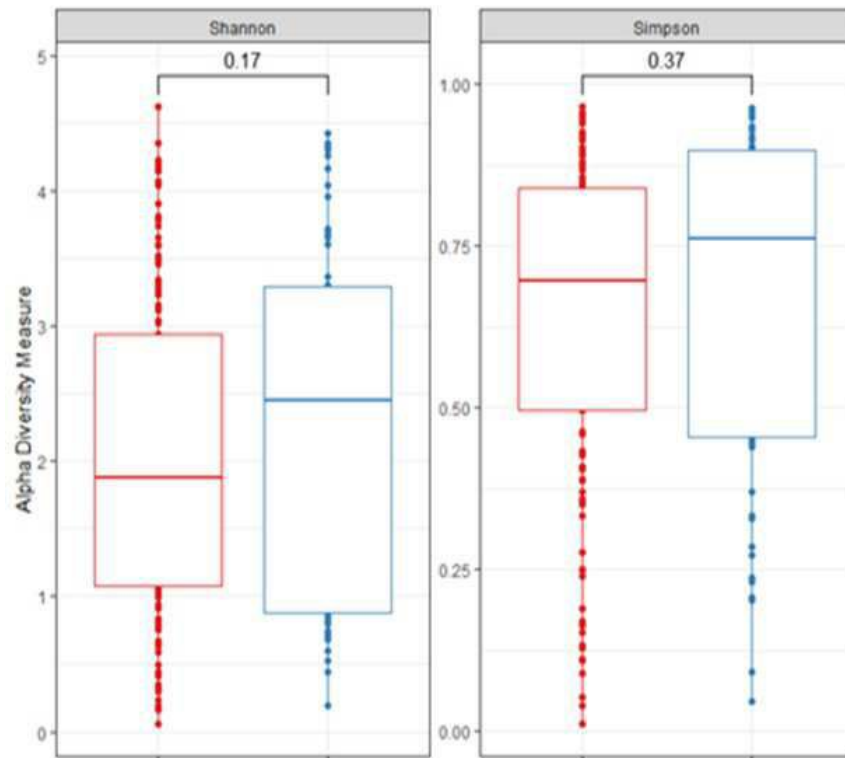
[0072] 스트렙토코커스 풍부도에 근거한 28일 사망률의 예측 확률은 86%의 민감도와 63%의 특이도로 ROC 곡선 아래 면적이 0.74였다. 이것은 APACHE 점수 (0.628)의 ROC 곡선 아래 면적보다 컸다. 1일째, 스트렙토코커스의 상대적 풍부도는 28일 생존군 환자 21/38 (55.3%) 및 28일 사망군 환자의 12/14 (85.7%)에서 9.6% 미만이었다.

도면

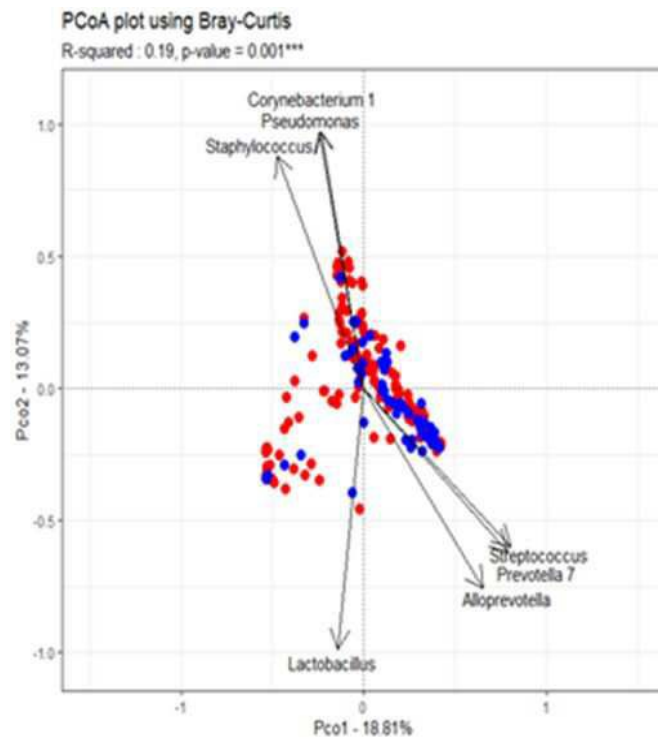
도면1a



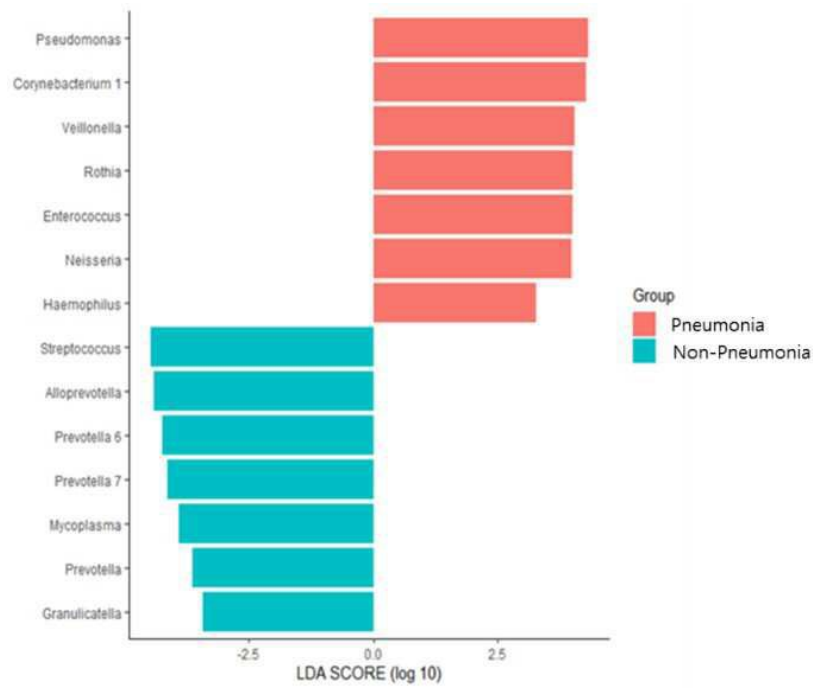
도면1b



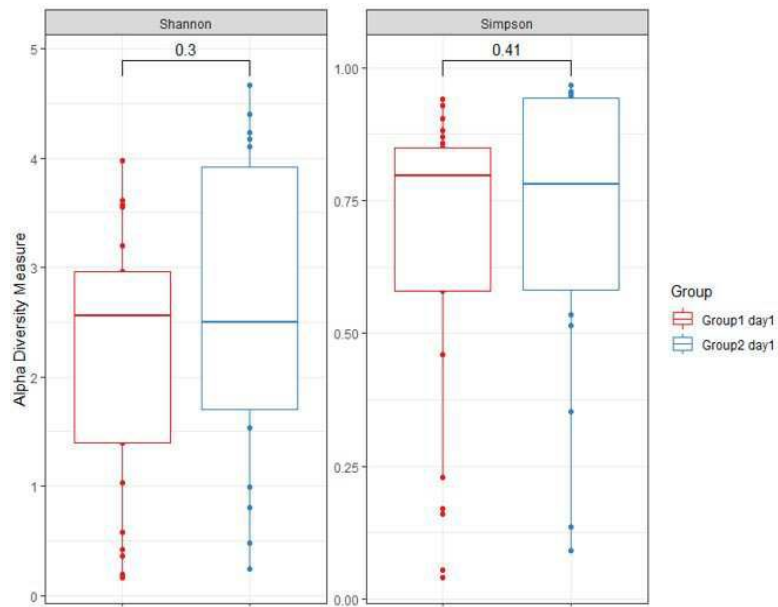
도면1c



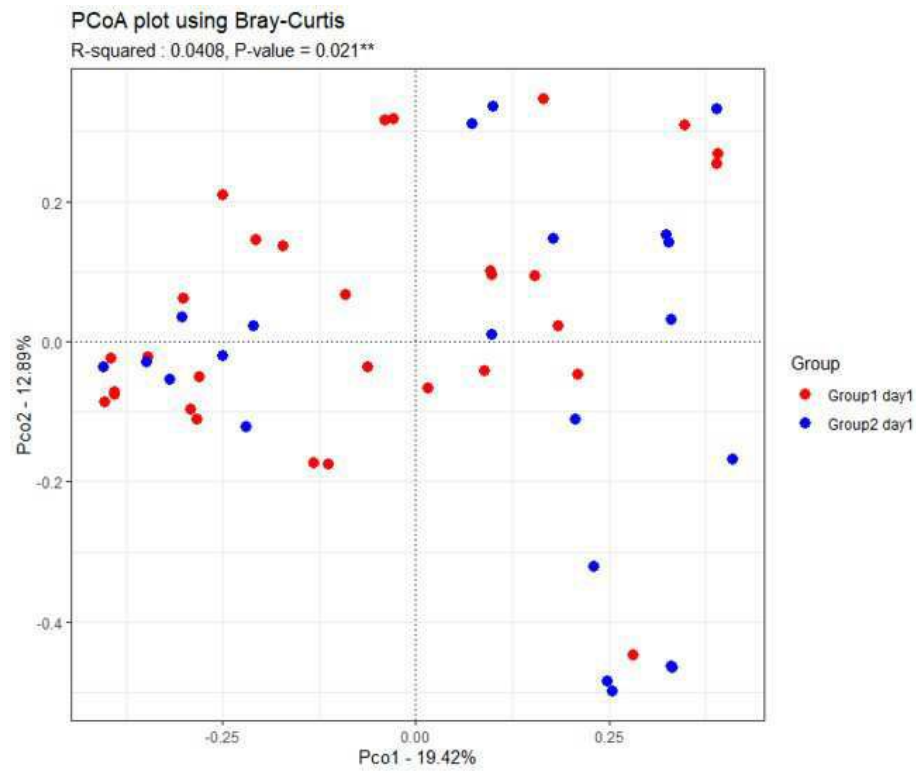
도면1d



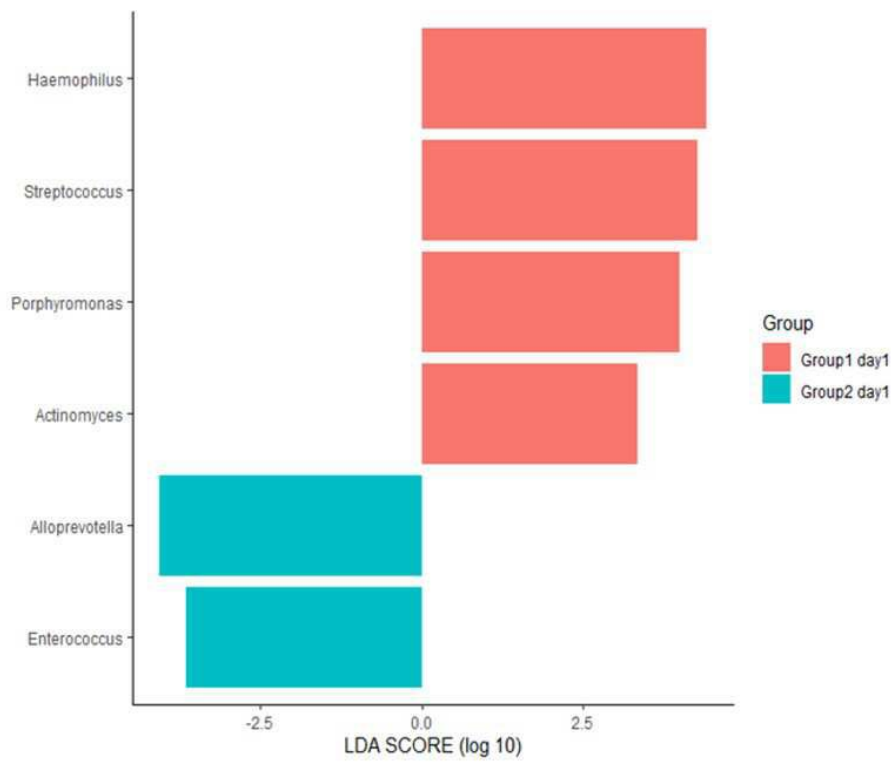
도면2a



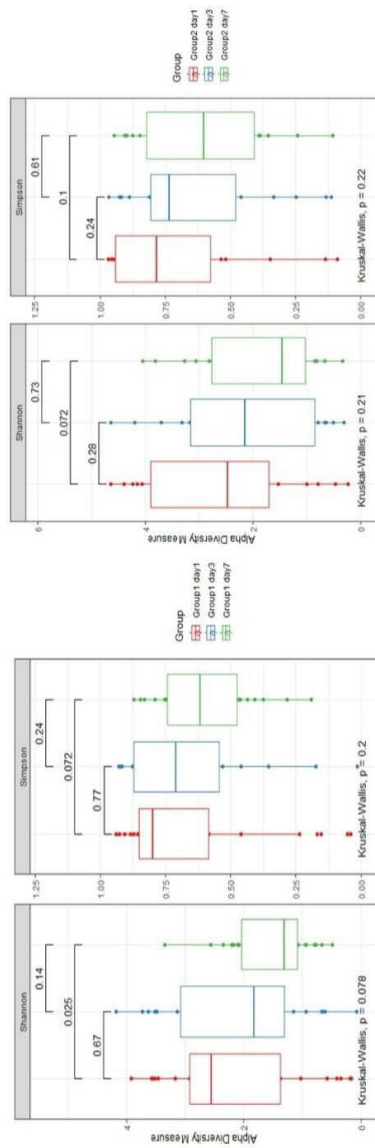
도면2b



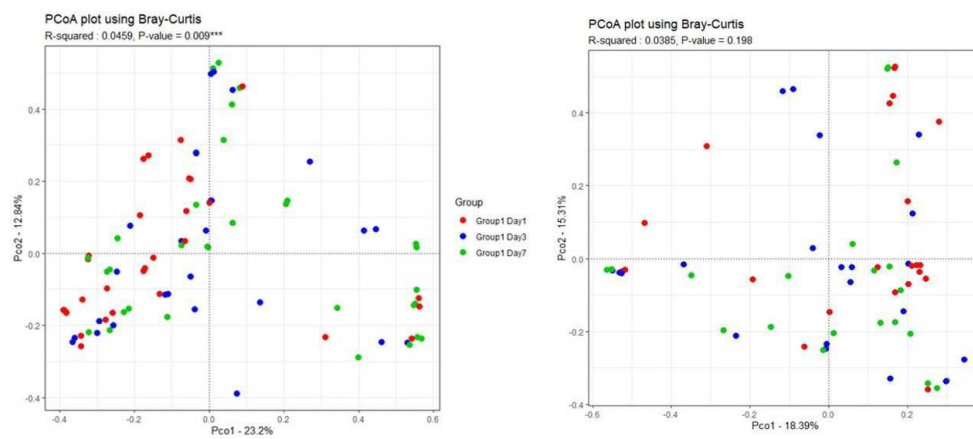
도면2c



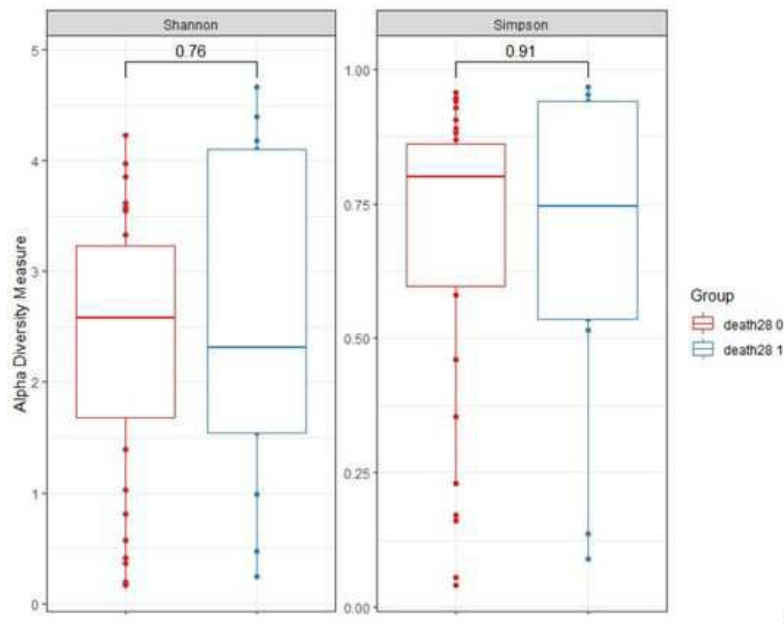
도면3a



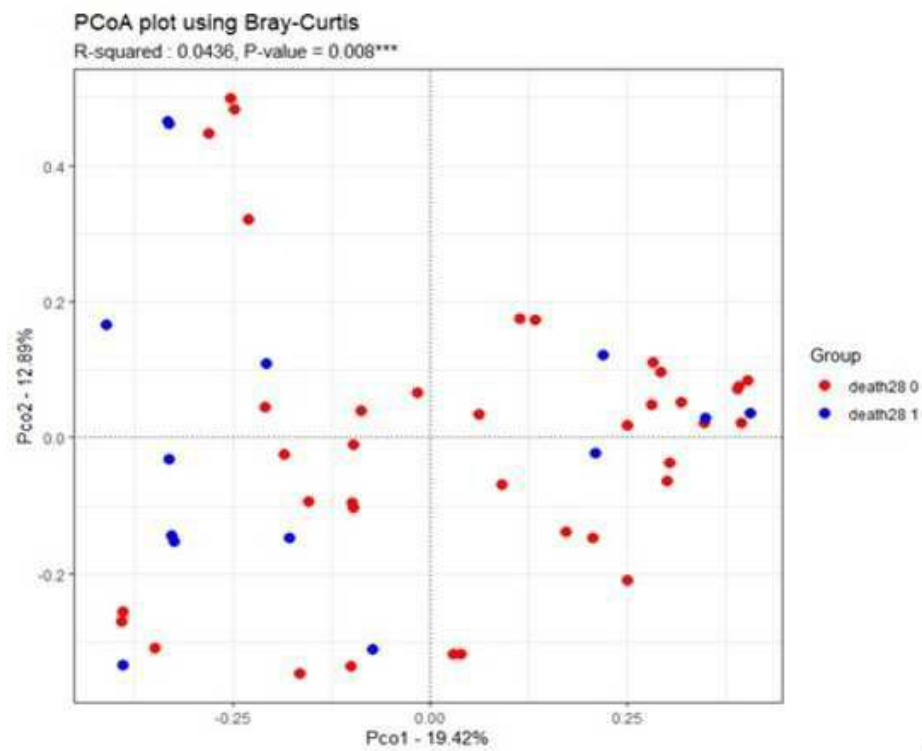
도면3b



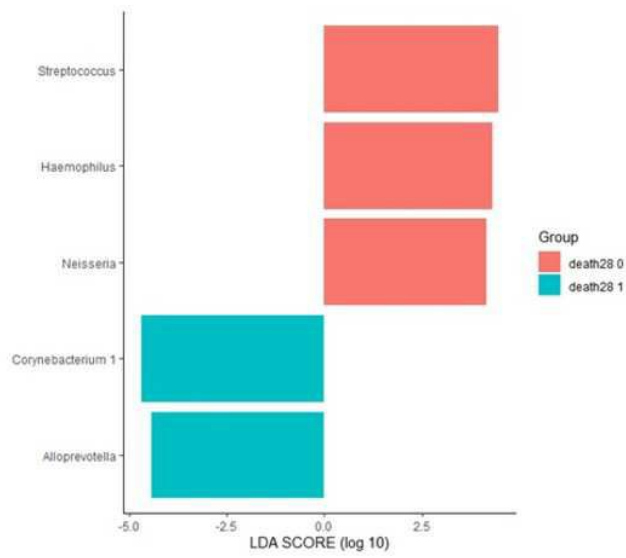
도면5a



도면5b



도면5c



도면5d

