(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월06일
(11) 등록번호 10-2485642
(24) 등록일자 2023년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 5/08 (2006.01) *A61B 10/00* (2006.01)
A61B 5/083 (2006.01) *A61B 5/091* (2006.01)
A61B 5/097 (2006.01) *G01N 33/497* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61B 5/082 (2013.01)
A61B 10/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7008057
(22) 출원일자(국제) 2020년08월26일
심사청구일자 2022년04월01일
(85) 번역문제출일자 2022년03월10일
(65) 공개번호 10-2022-0047317
(43) 공개일자 2022년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/048040
(87) 국제공개번호 WO 2021/041571
국제공개일자 2021년03월04일
(30) 우선권주장
62/891,954 2019년08월26일 미국(US)
63/069,120 2020년08월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100084528 A*
US20080038207 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제테오 테크, 인코포레이티드
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
(72) 발명자
브라이든 웨인 에이
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935
콜 차알스 제이
미국 87110 뉴멕시코주 앨버커키 인디언 스쿨 로드 5901
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이훈, 이두희

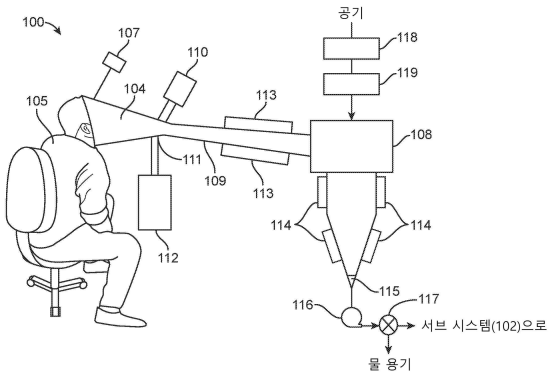
전체 청구항 수 : 총 28 항 심사관 : 이재균

(54) 발명의 명칭 **호기를 이용한 결핵 및 기타 질병의 진단**

(57) 요 약

호흡기 질환을 포함한 여러 질병에 대해 신속하고 저렴한 비용으로 자율적 현장 진단 분석을 가능하게 하는, 다양한 진단 도구를 사용하여 호기 에어로졸 및 호기 응축물을 분석하기 위한 방법 및 장치가 개시된다. MALDI-MS를 포함하는, 질량분석기를 이용한 결핵 진단을 위한 호기 에어로졸 및 호기 응축물의 분석 방법 및 장치가 개시된다. 개시된 시스템 및 방법은 약 20분 이내에 진단 테스트 결과를 제공하고 최소한의 인간 개입으로 자율적 작동을 제공한다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61B 5/0833 (2013.01)
A61B 5/0836 (2013.01)
A61B 5/091 (2013.01)
A61B 5/097 (2013.01)
G01N 33/497 (2019.01)
A61B 2010/0087 (2013.01)
(72) 발명자
우드 로빈
남아프리카공화국 웨스턴 케이프 7975 피쉬 호크 서니데일 기니아 파울 로드 3
첸 다펭
미국 21784 메릴랜드주 사익스빌 워필드 에비뉴 6935

명 세 서

청구범위

청구항 1

호기를 사용하는 호흡기 질환의 진단을 위한 시스템에 있어서,

사전 결정된 횟수의 호흡 기동 동안 개인으로부터 배출된 호기 에어로졸(EBA) 입자를 추출하기 위해 상기 개인의 얼굴을 수용하도록 구성된, 샘플 추출 요소;

상기 샘플 추출 요소를 통해 상기 EBA 입자를 수송하도록 상기 샘플 추출 요소 내로 공급되는 시스(sheath) 공기의 흐름을 제공하기 위한, 공기 펌프;

상기 샘플 추출 요소에 인터페이스 배관에 의해 유체 연결되는 샘플 포착 요소로서, 상기 EBA 입자의 크기가 성장할 수 있게 하는 응축 액체 샘플을 형성하도록 상기 샘플 포착 요소를 냉각하기 위한 하나 이상의 냉각 장치를 포함하는, 샘플 포착 요소; 및

상기 샘플 포착 요소에 유체 연결되고, 샘플 플레이트 상에 소량의 수집된 상기 응축 액체 샘플을 스폿팅하여 상기 샘플 플레이트 상에 수집된 상기 응축 액체 샘플을 처리하기 위한 샘플 처리 요소와 상기 응축 액체 샘플을 분석하기 위한 진단 장치를 포함하는, 샘플 분석 서브시스템을

포함하는 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 샘플 처리 요소는 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 산, 및 이들의 혼합물 중의 하나 이상을 사용하여 상기 샘플을 처리하기 위한 유체 요소를 포함하는 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 샘플 추출 요소와 유체 소통하도록 구성된 하나 이상의 센서를 더 포함하고, 상기 하나 이상의 센서의 출력물은 상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 호기 에어로졸 입자의 총 누적 부피를 산출하는 데 사용되는 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 하나 이상의 센서는 CO_2 센서, 산소 센서, 습도 센서, 광학 입자 크기 계수기, 공기역학적 입자 크기 측정기(aerodynamic particle sizer), 및 네펠로미터(nephelometer) 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 공기의 사전 결정된 부피는 상기 하나 이상의 센서의 출력물을 사용하여 결정되는 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 EBA 입자는, 상기 호흡기 질환의 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커 및 단백질체 바이오마커 특징 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 수집된 샘플의 부피는 100±10% 마이크로리터 내지 1±10% ㎖인 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 샘플 포착 요소는 임팩터를 더 포함하고, 상기 공기 펌프는 상기 추출 요소로부터의 호기를 상기 임팩터 내로 운반하기 위한 공기의 흐름을 제공하고, 상기 임팩터는 호기로부터 상기 EBA 입자를 분리하여 상기 수집된 샘플을 생성하는 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 임팩터는 사이클론, 습식 벽 사이클론(wetted wall cyclone), 하나 이상의 습식 필름 임팩터(wetted film impactor), 및 집진기(impinger) 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 임팩터의 상류에 배치된 하나 이상의 가상 충돌 스테이지(virtual impaction stage)를 더 포함하는 시스템.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 진단 장치는 PCR, rt-PCR, 면역 기반 분석, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, GC-MS, GC-IMS 및 MALDI-TOFMS 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 샘플 포착 요소는 상기 하나 이상의 냉각 장치를 사용하여 0℃±10% 초과 및 10℃±10% 미만의 온도로 냉각되는 시스템.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 샘플 포착 요소를 소독하기 위한 멸균 요소를 더 포함하는 시스템.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 멸균 요소는 소독제를 분무하기 위한 분무기, UV 방사선을 생성하기 위한 하나 이상의 UV 광, 증기 발생기, 오존 발생기, 과산화물 증기 발생기, 및 이들의 조합 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 소독제는 수중 60% 에탄올, 수중 60% 이상 이소프로판올, 및 과산화물 용액 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 수집된 샘플이 분배 펌프, 중력 유도 흐름, 및 로봇 샘플 전달 시스템 중의 하나 이상을 사용하여 상기 샘플 처리 요소로 전달되는 시스템.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 샘플 처리 요소는 유체 저장소, 및 샘플 기재 상에 배치된 상기 수집된샘플에 1±10% 마이크로리터의 유체를 분배하기 위한 유체 분배 펌프 중의 하나 이상을 더 포함하는 시스템.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 유체는 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 및 산 중의 하나 이상을 포함하는 시스템.

청구항 19

개인의 얼굴을 수용하도록 구성된 샘플 추출 요소, 인터페이스 배관에 의해 상기 샘플 추출 요소에 유체 연결된 샘플 포착 요소, 샘플 처리 요소 및 진단 장치를 포함하는 호흡기 질환의 진단을 위한 시스템에 의하여 상기 개인의 호기를 사용하여 개인의 호흡기 질환을 진단하기 위한 자율적 방법에 있어서,

상기 샘플 추출 요소 내로 공급되는 시스(sheath) 공기의 흐름 내로 사전 결정된 횟수의 호흡 기동 동안에 상기 개인으로부터 배출된 호기 에어로졸(EBA) 입자를 추출하는 단계;

상기 샘플 포착 요소를 사용하여 호기 및 공기로부터 상기 EBA 입자를 수집된 샘플로서 수집하되, 상기 EBA 입자의 크기가 성장할 수 있게 하는 응축 액체 샘플을 형성하도록 상기 샘플 포착 요소를 냉각하는 단계;

샘플 플레이트 상에 소량의 수집된 상기 응축 액체 샘플을 스폿팅하는 단계;

용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 산, 및 이들의 혼합물 중에서 하나 이상을 사용하여 상기 응축 액체 샘플을 처치함으로써 상기 응축 액체 샘플을 처리하는 단계; 및

상기 진단 장치를 사용하여 상기 응축 액체 샘플을 분석하는 단계를

포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 EBA 입자는, 상기 호흡기 질환의 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커 및 단백질체 바이오마커 특징 중의 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 처리하는 단계는 건조 수단을 사용하여 상기 샘플을 건조함으로써 상기 샘플을 농축하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 진단 장치는 MALDI-TOFMS를 포함하는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서,

상기 수집된 샘플을 분해(digest)하여 상기 EBA 입자의 펩티드 샘플 특징을 생성하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 24

제19항에 있어서,

상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 공기의 유속은 100±10% L/min 내지 1000±10% L/min인 방법.

청구항 25

제19항에 있어서,

상기 사전 결정된 횟수의 호흡 기동은

a. 깊은 날숨을 내쉬어 상기 개인의 폐를 깨끗하게 하는 단계;

b. 최대 10초 동안 일시 중지하는 단계;

c. FVC 들숨을 수행하는 단계;

d. 깊은 날숨을 내쉬는 단계; 및

e. 상기 a~d 단계들을 최대 10회 반복하는 단계를

포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

상시 호흡(tidal breath) 단계, 기침(coughing) 단계, 정상적 FVC 호흡(normal FVC breath) 단계, 말하기(speaking) 단계 및 재채기(sneezing) 단계 중에서 하나 이상을 더 포함하는 방법.

청구항 27

제19항에 있어서,

상기 사전 결정된 호흡 기동의 횟수는 내쉬는 입자의 부피 및 내쉬는 호흡의 부피 중에서 하나 이상을 나타내는 하나 이상의 센서에 의해 결정되는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 하나 이상의 센서는 CO_2 센서, 산소 센서, 습도 센서, 광학 입자 크기 계수기, 공기역학적 입자 크기 측정기(aerodynamic particle sizer), 및 네펠로미터(nephelometer) 중의 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2019년 8월 26일자 출원된 미국 가출원 62/891954호 "호기를 이용한 결핵 및 기타 질병의 진단" 및 2020년 8월 23일자 출원 미국 가출원 63/069120호 "호기를 이용한 결핵 및 기타 질병의 진단"과 관련되고 이에 대한 혜택을 주장하며, 이들 둘 다 전체가 참고로 여기에 포함된다.

[0002] 본 개시 내용은 호흡기 질환을 포함한 여러 질병에 대한 신속하고 저렴한 자동 현장 진료 분석이 가능하도록 다양한 진단 도구를 사용하여 호기 에어로졸(exhaled breath aerosols) 및 호기 응축물(exhaled breath condensates)을 분석하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 개시 내용은 MALDI-MS를 포함한 질량 분석기를 사용하여 결핵(tuberculosis) 진단을 위한 호기 에어로졸 및 호기 응축물을 분석하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 결핵(tuberculosis: TB)은 매일 4000명 이상이 사망하는 글로벌한 살인자로서 HIV/AIDS를 능가했다(Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood, "Detection of Mycobacterium tuberculosis bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients," Gates Open Research 2018, 1:11). 발병률 감소율은 보고된 연간 1.5%로 여전히 불충분하며 치료만으로는 질병의 부담을 상당히 줄일 수 있을 것 같지는 않다. HIV가 널리 퍼진 지역사회에서, 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis: Mtb*) 유전자형 연구에 따르면 재활성화보다는 최근 전파가 TB 발병 사례의 대부분(54%)을 차지한다. TB 전파의 물리적 과정은 아직 제대로 이해되지 않고 있고 감염성 에어로졸 생성, 방출 및 흡입의 주요 이벤트들을 설명하기 위한 신기술의 적용은 느리다. 공기 중 감염성 입자를 특성화하기 위한 경험적 연구는 드물다. 조사를 괴롭히는 2가지 주요 어려움은 자연적으로 생성된 *Mtb* 입자의 낮다고 알려진 농도와 공기 중 검체의 환경 및 환자 유래의 박테리아 및 곰팡이 오염의 합병증이다. 그럼에도, 공기 중 탐지에 대한 많은 시도가 있어 왔다. 우간다에서의 2004년 개념 입증 연구와 후속 타당성 연구에서는 폐결핵 환자로부터 기침으로 생성된 에어로졸을 샘플링했다. 2개의 자립형 캐스케이드 임팩터(viable cascade impactor)가 장착된 샘플링 챔버 내로 직접 기침을 하면 1~6일간의 화학 요법을 받았음에도 불구하고 참가자의 4분의 1 이상이 양성 배양 결과로 나왔다. 동일 장치를 사용한 후속 작업에서는 에어로졸 세균 부하가 더 높은 참가자가 더 높은 가정 전파율과 질병 발견의 발전과 관련될 수 있음이 발견되었고, 이는 정량적 공기 중 샘플링이 감염성의 임상적 관련 척도로서 기능할 수 있음을 시사한다. 따라서, 전파의 중단은 TB 발병률에 빠르고 측정 가능한 영향을 미칠 것이다.

[0004] 결핵의 전염을 통제하는 가장 좋은 방법은 능동적 TB 사례(active TB case)를 즉시 식별하고 치료하는 것이다(Rachel C. Wood, Angelique K. Luabeya, Kris M. Weigel, Alicia K. Wilbur, Lisa Jones-Engel, Mark Hatherill, and Gerard A. Cangelosi, "Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients", Sci. Rep. 5, 8668 (2015)). 폐결핵의 진단은 보통 환자 가래의 미생물학적, 현미경적 또는 분자적 분석에 의해 수행된다. 대부분의 개발도상국에서 TB 감염에 대한 "최적 표준(gold standard)" 테스트는 가래 검체를 기반으로 한 도말 배양이다. 상기 검체를 배양 플레이트에 문지르고 *Mtb*에 특이적 염색을 부가하여 상기 염색된 세포를 현미경을 사용하여 카운트한다. 만일 상기 도말에서 세포들의 농도가 설정된 임계값보다 크면, 상기 검체는 양성으로 분류된다. 만일 TB 수가 이 임계값 미만이면, 음성으로 분류된다. 진단에는 수 시간이 소요될 수 있다. 진단 검체로서 가래의 필요성은 환자로부터 수집하는 어려움과 복잡한 구성으로 인해 하나의 제한 요소이다. 상기 재료의 점도는 테스트 감도를 제한하고 검체들 간 이질성을 증가시키며, 테스트와 관련된 비용과 노동력을 증가시킨다. 또한, 가래 생성(기침이 필요함)은 직업상 의료 종사자에게 위험하다. 가래는 검체 배지로서 몇 가지 단점이 있다. 첫째, 환자의 약 50%만이 양호한 가래 검체를 제공할 수 있다. 예컨대, 약 8세 미만의 어린이는 요청에 따라 검체를 생산할 수 없는 경우가 종종 있다. 이는 일반적으로 목구멍 깊은 곳에서 가래를 "기침해내는" 능력이 발달하지 않았기 때문이다. 노인과 병자는 가래를 뱉어낼 힘이 없을 수 있다. 다른 사람들은 단순히 목에 가래가 없을 수 있다. 따라서, 객담(가래) 분석에 기반한 진단 방법은 가래 검체를 제공하는 환자의 50%만큼이나 진단을 제공하지 못할 수 있다. 또한, 가래는 더 이상 폐 깊숙한 곳의 질병 상태를 나타내지 않기 때문에, 항생제 치료를 받은 후 1~2일 후에 채취하는 경우에는 진단용 검체로 유용하지 않고, 치료 개시 후 며칠 이내에 가래 내의 살아있는 *Mtb*의 수가 크게 감소한다. 소변과 혈액이 TB 감염의 진단을 위한 검체 배지로 제안된 바 있다. 혈액은 매우 침습적이며 세계의 일부 지역에서 많은 TB 환자들이 HIV 동시 감염을 갖고 있기 때문에 종종 HIV 양성인 혈액 샘플을 처리하는 데 더 높은 비용이 수반된다. 또한, 능동적 TB 감염 환자는 혈액 내에 순환하는 결핵 세포가 많지 않을 수 있다. 소변 기반의 진단도 제안되었지만, 이들 검사는 살아있는 TB 간균(bacilli) 이외의 질병의 바이오 마커(biomarker)를 찾는 것이고 광범위한 임상 사용에 대해 검증된 것은 아무것도 없다.

[0005] 검체가 채취 및 취급이 더 쉽고 안전하며 균일하면, TB 진단이 단순화된다. 호기(exhaled breath)에는 에어로졸(aerosols: "EBA")과 증기가 포함되어 있어 이들은 비침습적으로 채취하고 특성을 분석하여 폐 내의 생리학적 및 병리학적 과정을 설명할 수 있다(Hunt, 2002). 분석용의 상기 호기를 포착하기 위해, 호기된 공기는 응축 장치를 통과하여 호기 응축물(exhaled breath condensate: "EBC")이라고 하는 유체 축적물을 생성한다. 주로 수증기에서 유래하지만, EBC는 사이토카인, 지질, 계면활성제, 이온, 산화 생성물, 아데노신, 히스타민, 아세틸콜린 및 세로토닌을 포함한 비휘발성 화합물 내에 용해되었다. 또한, EBC는 암모니아, 과산화수소, 에탄올 및 기타 휘발성 유기 화합물을 포함한 잠재적으로 휘발성인 수용성 화합물을 포착한다. EBC는 pH를 쉽게 측정할 수 있다. EBC는 에어로졸화된 기도 내막액과 폐 내에서 진행 중인 생화학적 및 염증성 활동의 비침습적 징후를 제공하는 휘발성 화합물을 포함한다. EBC에 대한 관심의 급속한 증가는 폐질환에서 EBC가 감염된 개인과 건강한 개인을 구별하는 데 사용할 수 있는 측정 가능한 특성을 갖는다는 인식에서 비롯되었다. 이들 분석은 급성 및 만성 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 성인 호흡곤란 증후군, 직업병, 및 낭포성 섬유증에서 기도 및 폐 산화환원 편차(lung redox deviation), 산-염기 상태, 염증의 정도 및 유형에 대한 증거를 제공해왔다. 불확실하고 다양한 희석도를 특징으로 하는 EBC는 고유한 기도 내막액 내의 개별 용질 농도에 대한 정확한 평가는 제공하지 않을 수 있다. 그러나, 농도가 건강과 질병 간에 크게 다르거나 검체 내에서 발견되는 용질의 비율을 기반으로 하는 경우에는 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0006] Patterson 등(2018)은 환자 유도 호기 에어로졸 샘플링을 최적화하고 단일 환자로부터 호흡 가능한 에어로졸을 분리 및 축적하도록 설계된 새로운 장치인 맞춤형 호흡 에어로졸 샘플링 챔버(respiratory aerosol sampling chamber: RASC)를 사용했다(Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood, "Detection of Mycobacterium tuberculosis bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients," Gates Open Research 2018, 1:11). 환경 샘플링은 챔버 공기에서 일정 기간 존재하는 *Mtb*를 검출한다. 새로 진단된 35명의 GeneXpert(Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA) 객담 양성 환자들이 약 1.4m^3의 부피를 갖는 RASC 챔버 내에 1시간 격리되는 동안 모니터링되었다. GeneXpert 유전자 분석은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 기반으로 하며 TB 진단을 위한 검체를 분석하고 TB 검체 내에 약물 내성 유전자가 있는지 여부를 나타내는 데 사용할 수 있다. TB에 대한 GeneXpert PCR 분석은 가래 샘플을 받아 약 1시간 내에 양성 또는 음성 결과를 제공할 수 있다. 상기 챔버에는 공기역학적 입자 크기 검출, 자립형(viable) 및 비자립형(non-viable) 샘플

링 장치, 실시간 CO_2 모니터링 및 기침 소리 녹음이 통합되었다. 미생물 배양 및 ddPCR(droplet digital polymerase chain reaction: 액적 디지털 중합효소 연쇄 반응)을 사용하여 각 바이오 에어로졸 수집 장치에서 *Mtb*를 검출했다. *Mtb*는 77%의 에어로졸 검체들에서 검출되었고 42%의 검체들은 미코박테리아 배양에서 양성이었고 92%는 ddPCR에서 양성이었다. 기침률과 배양 가능한 바이오 에어로졸 간에 상관관계가 발견되었다. *Mtb*는 에어로졸 크기 2.0~3.5 ㎛에서 피크로 모든 자립형 캐스케이드 임팩터 단계들에서 검출되었다. 이는 에어로졸 배양 양성에 대한 호기 공기의 0.09 CFU/리터의 중앙값(median)과 호기 미립자 바이오 에어로졸의 4.5×10^7 CFU/㎖의 추정 중앙값 농도를 시사한다. *Mtb*는 상기 RASC 챔버를 사용하여 치료를 받지 않은 대부분의 TB 환자가 호기한 바이오 에어로졸 내에서 검출되었다. 분자 검출은 고체 배지 상의 *Mtb* 배양보다 더 민감한 것으로 밝혀졌다.

[0007] *Mtb*는 배양, ddPCR, 전자 현미경, 면역분석 및 세포 염색(예컨대, oramine 및 dmnTre)에 의해 EBA에서 식별될 수 있다. 이들 중에서 PCR 및 면역분석은 종 수준에 대해 신속하고 특이적일 가능성을 갖는다. PCR 및 기타 게놈 기반 기술은 균주 수준에 따라 다를 수 있다. 질량 분석법은 또한 박테리아 감염에서 얻은 배양물의 균주 수준에 특이적인 것으로 나타났다. 예를 들어, Bruker Daltonics(독일)의 Biotyper는 인간에게 감염을 일으키는 최대 15000종의 박테리아를 식별할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 기술은 EBA로부터 TB 감염을 식별할 수 있는 것으로 나타났다. 리포아라비노만난(lipoarabinomannan)에 기반한 것과 같은 *Mtb* 검출을 위한 면역분석법도 잘 알려져있다.

[0008] 결핵(TB)의 경우, TB 감염자는 개인이 진료소에 내원할 때 수동적 사례 발견을 통해 진단되는 경우가 많다. 능동적 환자 발견 방식(active case finding: "ACF")은 일반적으로 일차 의료 시스템 외부에서 TB 감염이 의심되는 사람들에게 연락하는 다른 방법을 포함하는 것으로 고려된다. WHO에 따르면, ACF는 "신속하게 적용할 수 있는 검사, 시험 또는 기타 절차를 사용하여 능동적인 결핵이 의심되는 사람을 체계적으로 식별하는 것"이다. ACF의 목표는 감염된 사람들을 조기에 치료하여 평균 감염 기간을 줄임으로써 질병의 확산을 감소시키는 것이다. TB의 경우, 개인이 도움을 받기 위해 진료소에 갈 때쯤에는, 그 사람은 약 10명 내지 약 115명의 다른 사람들에게 TB 감염을 전파했었을 수가 있다. ACF는 심각한 TB 전파를 줄이거나 예방하는 데 도움이 될 수 있다. 객담(가래) 분석 및 혈액 분석과 같은 진단 시스템과 방법은 자동화되지도 않았고 자율적으로 운영되지도 않으며 신속하지도 않다. 많은 사람들이 각 분석에 소모되는 값비싼 분석법을 사용하므로, 특히 개발도상국 및 저개발 국가에서는 상기 능동적 환자 발견 방식을 위한 일반적인 유틸리티가 없다. 앞서 기술했듯이, EBA 분석은 값비싼 분석 및 소모품이 필요 없기 때문에 신속한 분석과 휴대성 및 저렴한 비용을 제공하는 TB 검출용의 강력한 진단 도구로 보인다. McDevitt 등(2013)은 인플루엔자 진단을 위한 EBA 분석 장치 및 방법을 보고했다(James J. McDevitt, Petros Koutrakis, Stephen T. Ferguson, Jack M. Wolfson, M. Patricia Fabian, Marco Martins, Jovan Pantelic, and Donald K. Milton, "Development and Performance Evaluation of an Exhaled-Breath Bioaerosol Collector for Influenza Virus", Aerosol Sci. Technol. 2013 January 1; 47(4): 444-451). 임팩터는 호기에서 큰 입자(>4㎛)를 제거하는 데 사용되며, 그 다음에는 더 작은 입자(<4㎛)에 대한 습식 필름 수집기가 사용된다. 수집된 입자들의 두 가지 사이즈 빈(bin)은 게놈 기반 방법인 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction: rt-PCR)을 사용하여 인플루엔자 바이러스에 대해 분석되었다. PCR 기술은 효소를 포함한 다른 생체 분자와 결합된 생체 분자 프로브를 사용하여 DNA의 특정 서열이 검체에 존재하는 경우 상기 특정 서열을 증폭한다. 표적 서열은 확인되는 질병에 특이적인 것으로 여겨진다. McDevitt 등은 EBA 검체가 인플루엔자 진단에 사용될 수 있음을 보여주었다. 상기 개시된 장치 및 방법은 실용적인 관점에서는 몇 가지 단점이 있다. 첫째, 호흡 에어로졸 검체는 부피가 수 밀리리터인 개별 샘플로 수집되므로, 상기 샘플을 농축하는 데 상당한 노력이 필요하다. 또한, 진단 장치가 샘플 수집기에 연결되거나 통합되지 않으며 ACF 도구로 잘 사용할 수 없다. TB 분석용의 자율적 진단 도구를 만들기 위해 RNA 분석을 자동화하는 기능은 명확하지 않다. 특정 환자에 의한 충분한 양의 기침이나 호흡 에어로졸이 발생했는지 여부를 확인하는 방법은 설명되어있지 않다. 그 결과, 검체가 인플루엔자에 대해 음성으로 밝혀지는 경우, 이는 부적절한 샘플 수집으로 인한 위음성 때문일 수 있다. 다양한 호흡 기동 도중에 생성되는 에어로졸화된 폐액의 양과 관련하여 인간들 간에 큰 변동성이 있다는 점이 잘 알려져 있다.

[0009] GeneXpert Ultra는 PCR 기술을 사용하는 첨단 게놈학 기반의 현장 진료 진단 장치이다. 결핵(TB) 및 기타 호흡기 질환의 ACF를 수행하도록 EBA 샘플 수집 방법과 통합될 수 있지만 상기 샘플 수집 시간이 너무 길어 실용적이지 않다. Patterson 등은 20 내지 200 TB의 간균이 일반적으로 EBA에서 생산되며 1시간의 샘플링 기간에 걸쳐 수집될 수 있음을 보여주었다(Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood,

"Detection of Mycobacterium tuberculosis bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients," Gates Open Research 2018, 1:11). GeneXpert Ultra를 진단 분석으로 사용하려면 최소 1시간의 샘플링이 필요하다. GeneXpert는 공기 중 병원체에 대한 공기 샘플을 분석하기 위해 공기를 샘플링하는 시스템과 통합될 수 있다. 상기 BDS 시스템(Northup Grumman, Edgewood, MD)은 우편물이 유통 센터를 통과할 때 탄저병을 유발하는 박테리아 포자에 대해 US Postal Service 우편물을 검사하는 데 사용된다. 습식 벽 사이클론을 GeneXpert PCR 시스템에 결합하여 자동으로 공기를 샘플링하고 병원체 존재 여부를 보고한다. 그러나, 상기 GeneXpert Ultra 분석은 테스트당 비용이 상대적으로 높으며 분석을 완료하고 결과를 제공하는 데 약 1시간이 걸린다. 일반적으로, PCR 기반 진단은 샘플링 및 분석에 필요한 시간이 길고 테스트당 비용이 상대적으로 높아 ACF 적용을 위한 TB 스크리닝에는 적합하지 않다.

[0010] 진단 분석에 연관된 시간은 현장 테스트 또는 "현장 진료" 테스트의 중요한 매개변수이다. ACF는 정의에 따라 의료 시스템 외부에서 발생하기 때문에 현장 진단 분석의 한 예이다. 미국에서 현장 진료 테스트는 20분 이내에 답을 제공해야 한다. 그렇지 않으면, 테스트가 너무 느리고 짧은 환자 대기 시간을 달성하기에 적합하지 않은 것으로 간주된다. 개발 도상국, 특히 TB 유병률이 있는 국가에서는 GeneXpert를 사용하여 약 1시간 내에 진단을 제공할 수 있다. 전술한 대로, 이 분석은 "테스트당 비용"을 기준으로 구현하는 데 비용이 많이 들기 때문에 아직 널리 배포되지는 않았다. 높은 비용으로 인해, 건강해 보이지만(무증상) TB 감염 가능성이 있는 환자를 선별하는 데 사용되지는 않고, 차라리 다른 검사나 요인에 의해 강력하게 의심되는 진단을 확인하는 데 사용된다.

[0011] Fennelly 등(2004)은 기침 에어로졸과, 능동적인 환자(active patient)를 갖는 것으로 알려진 개인들을 이용하는 2개의 Anderson 캐스케이드 임팩터가 수용된 수집 챔버를 사용한 TB 분석을 기술하였다(Fennelly K.P., Martyny J.W., Fulton K.E., Orme I.M., Cave D.M., et al. (2004) Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis: a new method to study infectiousness. Am J Respir Crit Care Med 169: 604-609). 개인들은 5분 동안 2번의 강렬한 기침을 하도록 요구되었다. 임팩트 받은 샘플을 배양하는 데는 30~60일이 걸렸으므로, 이러한 접근 방식은 자동화에 부합하지 않는다. 임상 샘플로서 EBA의 어려운 측면은 호흡에서 수집할 수 있는 호기 미립자의 상대적으로 작은 샘플이다. 또한, 상기 수집된 질량의 상당 부분은 물이다. 진단 정보를 포함하는 분자("바이오마커(biomarker)")는 나노리터 또는 피코그램의 양으로 존재한다. 결과적으로, 상기 에어로졸 수집 방법은 호기(exhaled breath)에서 바이오매스(biomass)의 많은 부분을 포착하는 데 효과적이어야 한다. 호기에는 들숨, 심호흡, 기침, 재채기를 포함한 여러 동작을 통해 폐에서 내쉬는 공기가 포함된다. 강제 폐활량(forced vital capacity: FVC)과 같은 심호흡 기동의 특정 유형은 호기의 량을 최대화하기 위해 가능한 한 많이 숨을 들이쉬고 최대한 멀리(또는 깊게) 내쉼으로써 폐활량의 최대 부피를 측정하는 데 사용할 수 있다. 강제 호기량(forced expiratory volume: FEV)은 강제 호흡 중에 한 사람이 내쉴 수 있는 공기의 양을 측정한다. 호기된 공기의 양은 상기 강제 호흡의 제1초(FEV1), 제2초(FEV2) 및/또는 제3초(FEV3) 동안 측정될 수 있다. 강제 폐활량(forced vital capacity: FVC)은 FEV 테스트 동안 내쉬는 총 공기량이다. 강제 호기량 및 강제 폐활량은 폐활량 측정 중에 측정되는 폐 기능 검사이다. 강제 호기량은 폐 기능의 중요한 측정이다.

[0012] 호흡 에어로졸과 호흡 응축물로 호흡기 질환을 검출할 수 있다는 연구 결과가 있지만, 결핵, 인플루엔자, 폐렴과 같은 감염 또는 질병에 대한 현대 임상 검사는 가래, 혈액 또는 비강 면봉을 계속 사용한다. 호기 분석 도구는 호기 내에 존재하는 미량의 분석 물질을 효율적으로 수집 및 농축하는 방법 및 장치가 부족하여 상용화되지 않았다. 또한, 특정 진단을 위해 호기가 얼마나 충분한지를 평가하는 표준이나 방법론이 없다. 개시된 예시적 장치 및 방법은 호기 에어로졸 및 호흡 응축물을 고 유속 및 고효율로 그리고 비교적 농축된 샘플로 수집함으로써 이러한 한계를 극복한다. 또한, 에어로졸의 크기 분류를 통합하여 분석 물질을 수집하기 이전에 특정 분석 물질에 대한 신호 대 잡음비를 증가시킬 수 있다. 그 다음, 농축된 샘플은 여러 방법으로 분석할 수 있지만, 관심있는 분석 물질에 민감하고 신속하며 매우 특이적인 방법을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 분석은 신속하고 실시간에 가까운 것이 보다 바람직하다. 질량분석기, 실시간 PCR 및 면역분석은 민감하고 특이적이고 거의 실시간에 가까운 잠재력을 지닌다.

[0013] 신속 및 민감하고 특이적이고 바람직하게는 테스트당 저렴한 비용을 특징으로 하는 진단 분석을 제공하기 위해서는, 객담 분석보다 더 빠르고 신뢰할 수 있고 혈액 분석보다 덜 침습적인 질량 분석법(mass spectrometry: "MS")과 같은 빠른 진단 도구와 결합될 수 있는 샘플 수집 방법이 필요하다. 이러한 시스템은 TB 및 기타 폐 또는 호흡기 질환의 능동적 환자 발견 방식(ACF)에 사용될 수 있다. ACF용 시스템이 효과적이려면 "진단당" 기준으로 신속하고 저렴해야 한다. 낮은 검사당 비용은 실제로 TB 감염된 소수를 검색하도록 TB 전파를 사전에 방지하기 위해 다수의 개인을 선별하기 위한 요구 사항이다. "일반 감기"에 감염되었을 가능성이 있는 환자가 리노바이러스에 감염되었을 수 있기 때문에, 인플루엔자 및 기타 병원성 바이러스의 현장 진단을 위해서는 저렴한

장치 및 방법 또한 필요하다. 일부 경우, 호흡기 감염이 박테리아나 곰팡이 미생물에 의해 유발되며 항생제로 치료할 수 있다. 다른 경우에는 상기 미생물이 항생제에 내성을 가질 수 있어 항생제에 대한 미생물 내성을 확인할 수 있는 진단 방법이 바람직하다. 기도의 바이러스 감염과 세균 감염 간을 구별하기 위한 신속한 EBA 방법이 요구되면서도, 불충분한 샘플 볼륨으로 인한 위음성의 발생을 최소화해야 한다. 질량분석법, PCR을 포함한 게놈학 방법 및 면역분석법이 민감하고 특이적일 가능성이 가장 높다. 질량 분석기, 특히 MALDI 비행시간 질량분석기(MALDI time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOFMS)는 민감하고 특이적이며 거의 실시간임이 입증되었으므로 EBA 및 EBC 샘플 분석에 선호되는 진단 도구이다.

발명의 내용

[0014] 능동적 환자 발견 방식(Active Case Finding)을 사용하여 현장 진료 의료 서비스를 가능하게 하고 질병 전파를 최소화하도록, 30분 이내, 바람직하게는 20분 이내의 TB 진단을 포함하여 신뢰할 수 있는 진단 결과를 제공하기 위한 EBA 및 EBC 분석을 위한 예시적인 방법 및 장치가 여기에 개시된다. 상기 장치 및 방법은 또한 환자당 비용이 저렴하며 자율적이다.

[0015] 호기(exhaled breath)를 사용한 개인의 호흡기 질환 진단을 위한 예시적인 자율 시스템이 개시되며, 이러한 예시적인 자율 시스템은, 개인의 얼굴을 수용하도록 구성되되 사전 결정된 횟수의 호흡 기동 동안 상기 개인으로부터 배출된 호기 에어로졸(EBA) 입자를 자신의 내부로 공급되는 공기의 흐름 내로 추출하는 샘플 추출 요소와, 인터페이스 배관에 의해 상기 샘플 추출 요소에 유체 연결되고 호기 및 공기로부터 상기 EBA 입자를 수집된 샘플로서 분리 및 수집하도록 구성된 샘플 포착 요소를 포함하는 샘플 수집 서브시스템; 그리고, 상기 샘플 포착 요소에 유체적으로 연결되고, 샘플 플레이트 상에 소량의 상기 수집된 샘플을 스폿팅하고 상기 샘플 플레이트 상에 수집된 샘플을 처리하기 위한 샘플 처리 요소와, 상기 샘플을 분석하기 위한 진단 장치를 포함하는, 샘플 분석 서브시스템을 포함한다. 상기 EBA 입자는 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커, 및 상기 호흡기 질환의 특징인 단백질체 바이오마커 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 샘플 포착 요소의 내부로 공급되는 공기의 유속은 약 100L/min과 약 1000L/min 사이일 수 있다. 상기 샘플 포착 요소의 내부로 공급되는 공기의 유속은 약 50L/min과 약 500L/min 사이일 수 있다. 상기 수집된 샘플의 부피는 약 100 마이크로리터와 약 1㎖ 사이일 수 있다. 상기 샘플 포착 요소는 공기 펌프 및 임팩터를 더 포함할 수 있고, 상기 공기 펌프는 상기 공기의 흐름을 제공하여 상기 추출 요소로부터의 호기를 상기 임팩터 내로 운반하고 상기 임팩터는 상기 EBA 입자를 호기로부터 분리하여 상기 수집된 샘플을 생성한다. 상기 임팩터는 사이클론, 습식 벽 사이클론, 하나 이상의 습식 필름 임팩터 및 집진기(impinger) 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 임팩터의 상류에 배치된 하나 이상의 가상 충돌 스테이지(virtual impaction stage)를 더 포함할 수 있다. 상기 샘플 추출 요소는 원뿔형 장치, 쉬라우드, CPR 구조 마스크, CPAP 마스크, 인공호흡기 마스크 및 의료용 범용 마우스피스 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 샘플 수집 서브시스템은 상기 개인을 수용하고 주변 공기로부터 상기 개인의 내쉬는 숨을 격리하기 위한 차폐 부스를 더 포함할 수 있고, 상기 샘플 추출 요소는 상기 차폐 부스의 벽을 통해 상기 샘플 포착 요소에 유체 연결된다. 상기 진단 장치는 PCR, rt-PCR, 면역 기반 분석, 질량 분석기(MS), MALDI-MS, ESI-MS, GC-MS, GC-IMS 및 MALDI-TOFMS 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 시스템은 상기 샘플 포착 요소를 냉각시키도록 상기 인터페이스 배관 및 샘플 포착 요소 중의 하나 이상의 벽과 열적 소통하도록 구성된, 하나 이상의 냉각 장치를 더 포함할 수 있다. 상기 샘플 포착 요소는 상기 하나 이상의 냉각 장치를 사용하여 약 0℃ 초과 및 약 10℃ 미만의 온도로 냉각될 수 있다. 상기 샘플 포착 요소는 상기 하나 이상의 냉각 장치를 사용하여 약 0℃ 초과 및 약 4℃ 미만의 온도로 냉각될 수 있다. 상기 하나 이상의 냉각 장치는 펠티에 열전 장치를 포함할 수 있다. 상기 샘플 추출 요소와 유체 소통하도록 구성된 하나 이상의 센서를 추가로 포함할 수 있고, 상기 하나 이상의 센서의 출력은 상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 호기 에어로졸 입자의 총 누적 부피를 산출하는 데 사용된다. 상기 하나 이상의 센서는 CO_2 센서, 산소 센서, 습도 센서, 광학 입자 크기 계수기, 공기역학적 입자 크기 측정기(aerodynamic particle sizer), 및 네펠로미터(nephelometer) 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 진단 장치를 사용하여 호흡기 질환을 진단하는 데 필요한 호기 기동의 횟수는 호기 에어로졸 입자의 상기 총 누적 부피를 사용하여 결정될 수 있다.

[0016] 상기 예시적인 시스템은 상기 샘플 수집 서브시스템을 소독하기 위한 멸균 요소를 더 포함할 수 있다. 상기 멸균 요소는 소독제를 분무하기 위한 분무기, UV 방사선을 생성하기 위한 하나 이상의 UV 광, 증기 발생기, 오존 발생기, 과산화물 증기 발생기, 및 이들의 조합 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 소독제는 수중 60% 에탄올, 수중 60% 이상 이소프로판올, 및 과산화물 용액 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 수집된 샘플은 분배 펌프, 중력 유도 흐름, 및 로봇 샘플 전달 시스템 중의 하나 이상을 사용하여 상기 샘플 처리 요소로 전달될 수 있다. 상기 분배 펌프는 연동 펌프일 수 있다. 상기 인터페이스 배관은 구리, 및 니켈-구리 Alloy 400 중

의 하나 이상으로 제조된 것일 수 있다. 상기 샘플 포착 요소는 구리, 및 니켈-구리 Alloy 400 중의 하나 이상으로 제조된 것일 수 있다. 상기 진단 장치는 MALDI-TOFMS를 포함할 수 있다. 상기 샘플 처리 요소는 유체 저장소, 및 샘플 기재 상에 배치된 상기 수집된샘플에 약 1 마이크로리터의 유체를 분배하기 위한 유체 분배 펌프 중의 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 유체는 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 및 산 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 개인은 결핵 및 코로나 바이러스 질환 중의 하나 이상에 감염된 사람과 비감염인 사람 중에서 하나 이상일 수 있다. 상기 지질 바이오마커는 *Mtb*를 특징으로 하는 바이오마커를 포함할 수 있다. 상기 샘플 포착 요소는 EBA 입자를 선택적으로 포착하기 위해 상기 샘플 추출 요소와 유체 소통하도록 배치된 충전층 컬럼(packed bed column)을 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스, 및 수화 Fe_3O_4 나노입자 중 하나 이상을 포함한 고체 입자를 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드를 포함할 수 있다.

[0017] 호기를 사용하여 개인의 호흡기 질환을 진단하기 위한 예시적인 자율적 방법이 개시되며, 상기 방법은, 개인의 얼굴을 수용하도록 구성된 샘플 추출 요소 내로 공급되는 공기의 흐름 내로 사전 결정된 횟수의 호흡 기동 동안에 상기 개인으로부터 배출된 EBA 입자를 추출하는 단계와, 인터페이스 배관에 의해 상기 샘플 추출 요소에 유체적으로 연결된 샘플 포착 요소를 사용하여 호기 및 공기로부터 상기 EBA 입자를 수집된 샘플로서 수집하는 단계와, 샘플 플레이트 상에 소량의 상기 수집된 샘플을 스폿팅하는 단계와, 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 및 산, 및 이들의 혼합물 중에서 하나 이상을 사용하여 상기 샘플을 처치함으로써 상기 샘플을 처리하는 단계와, 진단 장치를 사용하여 상기 샘플을 분석하는 단계를 포함한다. 상기 EBA 입자는 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커, 및 호흡기 질환의 특징인 단백질체 바이오마커 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 처리하는 단계는 적절한 건조 수단을 사용하여 상기 샘플을 건조함으로써 상기 샘플을 농축하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 진단 장치는 MALDI-TOFMS를 포함할 수 있다. 상기 샘플 포착 요소를 사용하여 호기 및 공기로부터 상기 EBA 입자를 수집된 샘플로서 수집하는 단계는, 상기 EBA 입자를 선택적으로 포착하도록 상기 추출하는 단계로부터의 출력물을 충전층 컬럼 내로 흐르게 하는 단계와, 샘플 추출 시스템에서 약 12.5% 아세트산, 약 70% 이소프로판올, 약 5% TFA, 약 5% 포름산, 및 약 10% HCl 중의 하나 이상을 사용하여 상기 충전층 컬럼으로부터 상기 EBA 입자를 추출하여 수집된 물질을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 예시적인 방법은 상기 수집된 샘플을 분해(digest) 하여 상기 EBA 입자의 특징적인 펩티드 샘플을 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스 및 수화 Fe_3O_4 나노입자 중 하나 이상을 포함한 고체 입자를 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 표면에 C18 작용기를 갖는 수지 비드를 포함할 수 있다.

[0018] 호기를 사용하여 개인의 호흡기 질환을 진단하기 위한 예시적인 자율적 방법이 개시되며, 상기 방법은, 호기로부터 EBA 입자를 추출하기 위한 샘플 추출 요소를 배치하도록 상기 개인에게 지시하는 단계와, 내쉬는 호흡으로부터 상기 샘플 추출 요소 내로 공급되는 공기 흐름 내로 EBA 입자를 배출하도록 사전 결정된 세트의 호흡 기동을 개시하는 단계와, 공기 중의 상기 EBA 입자를 샘플 포착 요소 내로 흐르게 하되, 상기 흐르게 하는 동안 샘플 포착 요소의 벽과, 상기 샘플 추출 요소와 샘플 포착 요소를 유체 연결하는 인터페이스 배관을 냉각시키는 단계와, 수집된 샘플을 생성하는 단계와, 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 및 산과, 이들의 혼합물 중에서 하나 이상을 사용하여 상기 샘플을 처치하는 단계를 포함한 상기 수집된 샘플을 처리하는 단계와, MALDI-TOFMS를 사용하여 플레이팅된 샘플을 분석하는 단계를 포함한다. 상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 공기의 유속은 약 100L/min 내지 약 1000L/min일 수 있다. 상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 공기의 유속은 약 50L/min 내지 약 500L/min일 수 있다. 상기 수집된 샘플의 부피는 약 100 마이크로리터 내지 약 1㎖일 수 있다. 상기 사전 결정된 세트의 호흡 기동은, 깊은 날숨을 내쉬어 상기 개인의 폐를 깨끗하게 하는 단계와, 최대 10초 동안 일시 중지하는 단계와, FVC 들숨을 수행하는 단계와, 깊은 날숨을 내쉬는 단계와, 상기 단계들을 최대 10회 반복하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 예시적인 방법은, 상시 호흡(tidal breath) 단계, 기침(coughing) 단계, 정상적 FVC 호흡(normal FVC breath) 단계, 말하기(speaking) 단계 및 재채기(sneezing) 단계 중에서 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 호흡기 질환은 결핵, 인플루엔자, 폐렴, 암, 및 코로나 바이러스에 의해 유발되는 질환 중에서 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 사전 결정된 호흡 기동의 횟수는 내쉬는 입자의 부피 및 내쉬는 호흡의 부피 중에서 하나 이상을 나타내는 하나 이상의 센서에 의해 결정될 수 있다. 상기 하나 이상의 센서는 CO_2 센서, 산소 센서, 습도 센서, 광학 입자 크기 계수기, 공기역학적 입자 크기 측정기(aerodynamic particle sizer), 및 네펠로미터(nephelometer) 중의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0019] 에어로졸화된 바이러스 및 박테리아 입자에 의해 유발되는 호흡기 질환의 진단을 위한 일 예시적 시스템이 개시되며, 상기 시스템은, 자신의 내부로 공급되는 공기의 흐름 내로 사전 결정된 공기의 부피 중의 EBA 입자를 수

집된 샘플로서 수집하되 상기 공기의 흐름이 약 30L/min 내지 약 1000L/min인 샘플 포착 요소와, 상기 샘플 포착 요소에 유체적으로 연결되고 샘플 플레이트 상에 소량의 상기 수집된 샘플을 스폿팅하고 상기 샘플 플레이트 상에 수집된 샘플을 농축하기 위한 샘플 처리 요소와 상기 샘플을 분석하기 위한 진단 장치를 포함하는 샘플 분석 서브시스템을 포함할 수 있다. 상기 샘플 처리 요소는 용매, MALDI 매트릭스 화학물질, 물, 산, 및 이들의 혼합물 중의 하나 이상을 사용하여 상기 샘플을 처리하기 위한 유체 요소를 포함할 수 있다. 상기 시스템은 상기 샘플 추출 요소와 유체 소통하도록 구성된 하나 이상의 센서를 더 포함할 수 있고, 상기 하나 이상의 센서의 출력물은 상기 샘플 포착 요소 내로 들어가는 호기 에어로졸 입자의 총 누적 부피를 산출하는 데 사용된다. 상기 하나 이상의 센서는 CO_2 센서, 산소 센서, 습도 센서, 광학 입자 크기 계수기, 공기역학적 입자 크기 측정기(aerodynamic particle sizer), 및 네펠로미터(nephelometer) 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 사전 결정된 공기의 부피는 상기 하나 이상의 센서의 출력물을 사용하여 결정될 수 있다.

[0020] 본 개시내용의 다른 특징 및 이점은 부분적으로 다음의 발명의 상세한 설명 및 첨부 도면에 설명될 것이며, 여기서 본 개시내용의 바람직한 측면이 설명되고 도시되고 부분적으로는 첨부된 도면과 함께 취해진 하기의 상세한 설명을 검토함으로써 통상의 기술자에게 명백해지거나 또는 본 개시내용의 실시에 의해 학습될 수 있다. 본 개시내용의 이점은 특허청구범위에서 특히 지적된 수단들 및 조합들에 의해 실현되고 달성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 본 개시내용의 전술한 측면들과 많은 부수적인 이점들은 첨부 도면들과 함께 하기의 상세한 설명을 참조함으로써 더 잘 이해되면서 더욱 쉽게 인식될 것이다.

도 1은 예시적인 EBA 기반 진단 시스템의 개략도이다.

도 2는 예시적인 EBA 샘플 수집 서브시스템의 개략도이다.

도 3은 EBA 샘플 수집 서브시스템에서 선택적으로 사용할 수 있는 격리 부스의 투시도이다.

도4a~4b는 TB(도 4a)와 비결핵 환자(도 4b) 간에 스펙트럼 특징에서 차이점들을 보여주는 호기 분석에서의 휘발성 유기 화합물 - 이온 크로마토그램이다.

도 5는 호기 에어로졸(EBA) 및 호기 응축수(EBC) 분석을 이용한 예시적인 진단 방법의 개략도이다.

도 6a~6c는 변형된 FVC 호흡 기동을 사용하여 3명의 건강한 개인으로부터의 호기의 입자 크기 분포 변동성을 보인다.

도 7은 다양한 호흡 기동 동안 호기의 이산화탄소 측정값을 보인다.

도 8은 다양한 호흡 기동 동안 호기로부터 수집된 폐액의 양을 보인다.

도 9는 TB 및 비-TB 샘플의 양이온 모드 및 음이온 모드에서 얻은 MS 신호의 가중 주성분 분석(PCA)을 보인다.

상기 도면들에서 참조를 위한 모든 도면부호, 지시선 및 설명선은 여기 상세히 설명된 것처럼 이러한 참조에 의해 통합된다. 도면의 일 요소에 부호를 매기지 않는다고 해서 권리를 포기하는 것은 아니다. 부호가 없는 참조는 도면과 청구항에서 문자로 식별할 수도 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 하기의 상세한 설명은 발명의 상세한 설명의 일부를 형성하는 첨부 도면들에 대한 참조를 포함한다. 도면들은 예시로서 개시된 시스템 및 방법이 실시될 수 있는 특정 실시예들을 도시한다. "예시(example)" 또는 "선택(option)"으로서 이해되어야 하는 이들 실시예는 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 실시할 수 있도록 충분히 상세하게 설명된다. 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서, 실시예들이 결합될 수 있고, 다른 실시예들이 활용될 수 있거나, 구조적 또는 논리적인 변경이 이루어질 수 있다. 따라서, 하기의 상세한 설명은 제한적인 의미로 받아들여서는 안 되며 본 발명의 범위는 특허청구범위 및 그의 법적 등가물에 의해 정의된다.

[0023] 본 개시내용에서, 에어로졸은 일반적으로 공기 중 또는 기체 중에 분산된 입자의 현탁액(suspension)을 의미한다. "자율적(autonomous)" 진단 시스템 및 방법은 "의료 전문가의 개입없이 또는 최소한의 개입없이" 진단 테스트 결과를 생성하는 것을 의미한다. 미국 FDA는 의료 장치와 관련된 위험과 장치의 안전성과 유효성을 합리적으로 보장하는 규제의 양을 평가하여 의료 장치를 분류한다. 장치는 클래스 I, 클래스 II 또는 클래스 III의 3가지 규제 클래스 중의 하나로 분류된다. 클래스 I에는 가장 낮은 위험도가 있는 장치가 포함되고 클래스 III에는

가장 높은 위험도가 있는 장치가 포함된다. 모든 클래스의 장치들은 일반 통제(General Control) 대상이다. 일반 통제(General Control)는 모든 의료 장치에 적용되는 식품, 의약품 및 화장품 법(the Food, Drug and Cosmetic (FD&C) Act))의 기본 요건이다. 체외(in vitro) 진단 제품은 질병 또는 그 후유증을 치유(cure), 경감(mitigate), 치료(treat) 또는 예방(prevent)하기 위해 건강 상태 결정을 포함하여 질병 또는 기타 증상의 진단에 사용하기 위한 시약, 도구 및 시스템이다. 이러한 제품은 인체에서 채취한 표본의 수집, 준비 및 검사에 사용하기 위한 것이다. 여기에 공개된 예시적인 장치는 자율적으로 작동하고 높은 신뢰도의 결과를 생성할 수 있으며 결과적으로 클래스 I 장치로서 규제될 가능성이 있다. 결핵(TB) 감염률이 높은 일부 지역에서는 의료 훈련을 받은 직원에 대한 접근은 매우 제한적이다. 자율적 진단 시스템은 자율적이지 않은 시스템보다 선호된다.

[0024] 용어 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 포함하는 데 사용되며, 용어 "또는"은 달리 표시되지 않는 한 비배타적인 "또는"을 나타내는 데 사용된다. 또한, 본 명세서에 사용된 어구 또는 용어는 달리 정의되지 않은 한 단지 설명을 위한 것이며 제한을 위한 것이 아님을 이해해야 한다. 본 개시에서 달리 명시되지 않는 한, 용어 "약"의 범위를 해석함에 있어서, 개시된 값(치수, 작동 조건 등)과 관련된 오차 범위는 본 개시내용에서 지시된 값의 ±10%이다. 백분율로 개시된 값과 관련된 오류 범위는 표시된 백분율의 ±1%이다. 특정 단어 앞에 사용되는 "실질적으로"라는 단어에는 "특정된 범위에서 상당한 수준" 및 "대부분이 특정되나 전체가 특정되는 것이 아닌"의 의미가 포함된다.

[0025] 본 발명의 특정한 측면들은 개시된 방법 및 시스템의 구성, 원리 및 작동을 예시하기 위한 목적으로 아래 상당히 상세하게 설명되어 있다. 그러나, 다양한 변형이 이루어질 수 있으며, 본 발명의 범위는 기술된 예시적인 측면들로 제한되지 않는다.

[0026] 호기 분석(exhaled breath analysis: "EBA")에 기반한 일 예시적 진단 시스템(100)은 EBA 샘플 수집 서브시스템(101) 및 분석 서브시스템 시스템(102)을 포함할 수 있다(도 1~3). 이들 두 서브시스템은 아래 상세히 설명된다.

[0027] EBA 샘플 수집 서브시스템(101)

[0028] 서브시스템(101)은 쉬라우드(shroud) 및 헐렁한 원추형 장치 중 적어도 하나의 형태일 수 있는 샘플 추출 요소(104)를 포함할 수 있다. 개인의 얼굴을 수용하기에 적합하거나 또는 스트랩 등을 사용하여 환자/개인(105)의 얼굴/머리에 제거 가능하게 부착될 수 있는 밀착형의 적합한 마스크도 사용될 수 있지만, 모든 인간에게, 특히 수염/수염이 있는 남성에게 잘 맞는지가 보장하기 어렵기 때문에 바람직하지 않다. 개인은 검사실 또는 검사 영역의 주변 공기로부터 환자의 EBA를 격리하도록 임의의 차폐 부스(containment booth)(106)에 앉을 수 있다. 일 예시적 차폐 부스(106)는, 차폐 부스(106)가 추출 요소(104)와 유체 연통하도록 혈량계 요소를 본 명세서에 기술된 추출 요소(104)로 교체함으로써 변형된 폐 기능 테스트 본체 박스(Morgan Scientific Inc.(Haverhill, MA)에 의해 판매됨)를 포함할 수 있다. 차폐 부스(106)는 또한 Wood 등(2016)이 기술한 호흡 에어로졸 샘플링 챔버(Respiratory Aerosol Sampling Chamber: RASC) 챔버의 변형된 버전일 수 있고, 상기 Wood 등이 기술한 특징과 기능을 통합할 수 있다(Wood R., Morrow C., Barry C.E., III, Bryden W.A., Call C.J., Hickey A.J., et al. : Real-Time Investigation of Tuberculosis Transmission: Developing the Respiratory Aerosol Sampling Chamber (RASC). PLoS One. 2016; 11(1): e0146658). Wood 등(2016)의 개시물, 즉 참조문헌 섹션에 인용된 비특허 문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 상기 RASC 챔버 내에서, 참가자는 앉아서 호기 샘플링 프로토콜에 수동적으로 참여하게 된다. Wood 등에 요약된 단계에 따라 상기 챔버 내에서 약 1시간이 소요된다. 간단히 말해서, 상기 챔버가 밀봉되고, 10분 동안 고효율 미립자 포집(high-efficiency particulate arrestance: HEPA) 필터를 통해 주변 공기를 동반하는 공기 퍼지(air purge) 단계가 수행된다. 그 다음에는 참가자 주도 오염 단계가 뒤따르며, 여기서 상기 챔버는 외부 환경과 격리되고 호기된 공기의 비율이 주변 수준(40000ppm로 가정된 호기 CO_2 농도 기준)보다 4000ppm 높은 챔버 CO_2 농도로 정의되는 10% 임계값까지 상승하도록 허용된다. 측정된 CO_2는, Wood 등이 기술한 바와 같이, 호기량을 계산하는 데 사용할 수 있다. 만일 30분이 경과한 후에도 목표에 도달하지 않으면, 더 낮은 호기 비율에서 샘플링 단계가 시작된다. 샘플링 후, 상기 챔버는 공기에서 잔류 *Mtb*를 제거하도록 다시 퍼지된다. 상기 샘플링 챔버의 오염은 자발적 기침이나 재채기 외에도 일차적으로는 상시 호흡(tidal breath)에 의해 유발되었다. 호흡 이외의 출처에서 파생되는 입자 및 유기체는, 샘플링 동안에 주변 오염을 최소화하기 위해 전신 DuPont Tyvek 슈트의 착용과 초기 퍼지 단계를 통해 최소화되었다. 추출 요소(104)는, 환자(105)의 입과 코를 통해 방출된 에어로졸 입자를, 추출 요소(104)의 출구를 향한 상기 에어로졸의 이송을 돕는 공기 공급원(107)으로부터 공급되는 시스 유체(sheath fluid)(일반적으로 공기)로서 작용하는 공기의 흐름 내로 추출하여 추출 요소(104)의 벽에 퇴적됨이 없이 샘플 포착 요소(108) 내로 추출

하는 기능을 한다. 공기 공급원(107)은 공기 펌프 또는 공기 컴프레서일 수 있다. 추출 요소(104)의 예는 Milton 그룹이 사용하는 깔때기 모양의 콘(cone)이나 Fennelly가 사용하는 안면 마스크이다(Fennelly K.P., Martyny J.W., Fulton K.E., Orme I.M., Cave D.M., et al. (2004) Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis: a new method to study infectiousness. Am J Respir Crit Care Med 169: 604-609). 상기 공기 시스 유체는 벽을 통해 또는 추출 요소(104)의 큰 테두리에, 또는 보다 일반적으로는 상기 차폐 부스(106) 내에 부가될 수 있다. 추출 요소(104)에 공급되는 공기 흐름은, 주변 공기의 먼지와 비생체 접촉 매개물을 포함하되 이에 국한되지 않는 거의 모든 입자상 물질을 제거하도록, (예컨대, HEPA 필터를 사용하여) 적절히 필터링된다. HEPA(High Efficiency Particulate Air) 필터는 0.3 미크론 입자의 99.97%를 걸러낼 수 있는 필터를 기술하는 데 사용되는 명칭으로서, 주변 공기 중의 먼지와 그을음을 포함하되 이에 국한되지 않는 모든 또는 거의 모든 입자 물질을 제거하는 데 사용된다. 또한, 상기 시스 유체 흐름은 EBA 입자 크기 성장을 가능하게 하도록 가습될 수 있으며, 이에 따라 호흡 내에 있는 입자들의 많은 부분이 상기 에어로졸 포착 요소(108)의 하류에서 포집될 수 있다. 인터페이스 배관(109)은 추출 요소(104)를 샘플 포착 요소(108)에 유체 연결하고 EBA 입자의 크기가 성장할 수 있도록 추가로 냉각될 수 있다. 냉각은 냉각 시스템을 사용하거나 더 바람직하게는 작고 경량이며 작동에 더 적은 전력을 소비하는 펠티에(Peltier) 열전 냉각 장치(113)를 사용하여 제공될 수 있다. 예를 들면, Marlow Industries(Dallas, TX), TE Technologies Inc.(Traverse City, MI)에 의해 공급되는 펠티에 냉각 장치는 일반적으로 교호하는 n형 및 p형 반도체 어레이를 포함한다. 상기 어레이는 전기적으로 직렬 그리고 열적으로 병렬인 2개 세라믹 플레이트 간에 납땜된다. 비스무트 텔루라이드(bismuth telluride), 안티몬 텔루라이드(antimony telluride) 및 비스무트 셀레나이드(bismuth selenide)가 180~400 K에서 최고의 성능을 제공하고 n형 및 p형 둘 다로 만들 수 있기 때문에 펠티에 효과 장치에 선호되는 물질이다. 펠티에 효과는 결합된 n형 및 p형 반도체에 전압을 인가하여 전류를 생성하면 두 전기 접합부 간에 열 전달에 의한 온도 차이를 생성한다. 한 접합부에서 열이 제거되고 냉각이 발생한다. 열은 다른 접합부에 축적되며 팬이나 송풍기로 쉽게 제거된다.

[0029] 추출 요소(104)는 환자가 이전 환자에 의해 방출된 병원체에 오염되거나 감염될 위험을 제한하도록 일회용일 수 있다. 대안적으로, 추출 요소(104)는 재사용 가능할 수 있으며, 이 경우 적합한 분무기를 사용하여 생성된 소독 스프레이 린스, UV 방사선, 과산화물 용액 또는 증기 처리, 증기 멸균 또는 이들의 조합 중에서 적어도 하나를 사용하여 멸균 요소(110)를 사용하여 멸균될 수 있다. Collision-type nebulizer(CH Technologies에 의해 공급됨)와 같은 분무기는 상기 콘의 배출구 근처, 즉 목부(111) 근처에 유체 연결될 수 있다. 린스 액은 추출 요소(104), 배관(109) 및 포착 요소(108)를 소독하기 위해 분무된다. 상기 린스 액은 EBA 및 응축된 EBA(호기 응축물) 샘플 및 샘플링 서브시스템(101)의 구성요소가 일반적으로 멸균 상태로 유지되도록 선택된다. 예를 들어, 만일 이소프로필 알코올에 70% 에탄올을 사용하는 경우, 이 소독제 용액은 증발에 의해 상기 샘플에서 쉽게 제거될 수 있어 분석을 방해하지 않는다. 멸균 요소(110)(예컨대, 분무기)는 샘플 수집 기간이 끝날 때 잠시 활성화되어 입구 배관(109) 및 포착 요소(108)의 최종 헹굼을 제공할 수 있다. 분무기(110)는 다음 환자에 의한 재사용 전에 샘플 추출 요소(108)를 세척하도록 다시 활성화될 수 있다. 폐액은, 펌프(116)를 폐기물 용기에 유체 연결하도록 밸브(117)를 전환함으로써 펌프(116)를 사용하여 폐기물 용기로 펌핑될 수 있다. 예시적인 샘플 추출 요소(104) 및 샘플 포착 요소(108)가 환자들 간에 소독될 수 있지만, MS 진단 장치가 있는 예시적 시스템(100)은, 심지어 미량의 오염 물질의 존재에도 관심 바이오에어로졸 단편에 대한 높은 감도 때문에 다른 개인들 간에 상기 예시적 시스템의 100% 오염 제거를 필요로 하지는 않는다.

[0030] 추출 요소(104) 및 배관(109)은 직경이 수렴/발산하는 것으로 도시되어 있지만, 상기 배관의 직경은 추출 요소(104)의 목부(111)의 직경과 동일할 수 있거나 또는 목부(111) 직경보다 더 크거나 작을 수 있다. 센서(112)는 CO_2 센서 및 입자 크기 측정기/계수기를 포함하나 이에 제한되지 않고, 목부(111) 근처의 추출 요소(104)에 유체 연결될 수 있다. 센서(112)는 샘플링된 호기의 부피의 표시를 제공한다. 지속적인 CO_2 모니터링은 주어진 시간에 차폐 부스(106) 내의 각 참가자에 대한 호기량의 비율에 대해 근접하는 근사치를 가능케 한다. 예를 들어, 폐활량이 감소하고 강제 폐활량(FVC)이 비교적 작거나(예컨대, 2리터 미만) 또는 약한 기침(예컨대, 호기의 1리터 미만)을 갖는 사람의 경우, 상기 환자는 자동으로, 그리고 충분한 양의 호기 에어로졸이 수집될 때까지 더 많은 FVC 호흡 또는 기침을 제공하도록 실시간으로 지시받는다. Wurie(2016)는 정상의 상시 호흡(tidal breathing) 동안 결핵 환자의 바이오 에어로졸 생성과 전염 위험에 대한 의미에 대해 기술한다. 광학적 입자 계수기 기술을 사용하여 시간 경과에 따른 4개 그룹(건강한/비감염 환자, 건강한/*IMtb*-감염 환자, 흉부외 TB 환자 및 흉부내 TB 환자)에 걸쳐 15회 상시 호흡하는 동안 호기된 공기 내의 에어로졸 크기와 농도(직경 0.3~20 ㎛ 범위)를 측정하였다. 높은 입자 생성은 모든 참가자 중에서 중앙값 카운트(median count)를 초과하는 1~5 ㎛ 크

기의 바이오 에어로졸 수로 정의되었다(중앙값 수 = 2 카운트/L). 188명의 참가자로부터 얻은 데이터는 치료 전(기준선)이었다. 바이오에어로졸 생성은 개인마다 상당히 다양했다. 다변수 분석에 의하여, 흉부내 TB는 건강한/비감염 개인들과 비교하여 1~5 ㎜ 바이오에어로졸의 높은 생성에 대한 확률에서 3.5배 증가와 연관됨이 나타났다. 참고문헌 섹션에 인용된 비특허 문헌 Wurie(2016)는 그 전체가 참고로서 여기에 포함된다.

[0031] EBA 샘플 포착 요소(108)는 습식 벽 사이클론(도 2 참조), 하나 이상의 임팩터(예를 들면, Milton에 의해 시연되듯이), 또는 집진기(impinger)일 수 있고, 이는 세척 후 건조 수집 방법 또는 거의 건조 수집 방법을 사용하여 상기 사이클론의 수집 표면으로부터 EBA 입자들의 재부유를 초래한다. 예시적 포착 요소(108)로는, 습식 필름 임팩터(McDevitt, 2013), Coriolis™ 습식 벽 사이클론(Bertin, France), BioSampler(SKC, Inc, Eight Four, PA)와 같은 집진기, BioCapture(FLIR Systems, OR)와 300L/min 습식 벽 사이클론(King, 2012)과 같은 충돌 기반 장치, BioSpot Sampler(Aerosol Devices, Fort Collins, CO)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. McDevitt의 습식 필름 임팩터와 BioSpot Sampler는 가습과 응결의 조합을 사용하여 에어로졸 입자의 크기를 "성장"시킴으로써 EBA에서 서브미크론 크기 입자의 수집 효율을 향상시킨다. 아래 참조문헌 섹션에 인용된 McDevitt 및 King이 출간한 비특허 문헌과 그의 내용 각각은 그 전체가 참고로서 여기에 포함된다(James J. McDevitt, Petros Koutrakis, Stephen T. Ferguson, Jack M. Wolfson, M. Patricia Fabian, Marco Martins, Jovan Pantelic, and Donald K. Milton, "Development and Performance Evaluation of an Exhaled-Breath Bioaerosol Collector for Influenza Virus", Aerosol Sci. Technol. 2013 January 1; 47(4): 444-451; Maria D. King, Andrew R. McFarland, "Bioaerosol Sampling with a Wetted Wall Cyclone: Cell Culturability and DNA Integrity of Escherichia coli Bacteria", Aerosol Sci. Technok, 46:82-93, 2012). EBA 에어로졸 입자는 액체 내로 직접 수집되거나 또는 필터 매체 상에 수집되고, 상기 필터를 통해 물 또는 용매를 역세척(backflushing) 하거나 용해성 필터 재료를 사용하여 필터를 용해하거나 또는 필터를 액체 내에서 분쇄한 다음, 그 결과 슬러리를 분석함으로써 추출할 수 있다. EBA 에어로졸 입자는 입자를 건조한 표면에 충돌시킨 다음, 적절한 유체로 상기 표면의 입자를 세척하여 수집할 수 있다. 가상 임팩터(virtual impactor)는 특정의 "절단 크기"와 상기 절단 크기보다 더 큰 에어로졸을 농축하는 데 사용할 수 있다. 미국 특허 제6,062,392호에 기재된 바와 같은 가상 임팩터는 미국 특허 제6,267,016호에 보이듯이 호기를 포함하는 공기의 유입 공기 유속(inlet air flow rate)을 증가시키도록 임팩터 및 기타 장치와 결합될 수 있다. 샘플 포착 요소(108)는 서브마이크론 입자를 마이크론 크기 입자로 성장시키기 위한 응축 성장 튜브를 포함할 수 있다. 바이오마커는 *Mtb* 세포벽으로부터의 지질을 포함할 수 있고, 이들 지질은 *Mtb* 세포 외에 질병 진단에 사용될 수 있다. 상기 호기 샘플은 100%에 아주 가깝게 수집된다. 수집한 샘플(115)을 식염수로 희석할 필요는 없다.

[0032] EBA 에어로졸 입자 포착 요소(108)는 약 100 L/min 내지 약 1000 L/min의 유속 시스 유체(flow rate sheath fluid)(공기)를 가질 수 있다. 공기 유속(air flow rate)은 200L/min 초과가 바람직하며 대략 300L/min 정도이다. McDevitt는 130L/min의 유속을 사용했는데 이는 기침 중에 생성된 EBA를 확실하게 포착하기에는 충분하지 않다. 높은 유속은 기침 기동 중에 역류로 인한 에어로졸 손실을 최소화한다. 유속이 높을수록 이는 EBA 입자의 더 많은 비말 동반으로 이어진다. 바람직하게는, 상기 에어로졸 포착 요소(108)는 입자를 작은 부피의 응축된 샘플(115)로 수집하고, 따라서 농축된 에어로졸 바이오매스(예를 들어, 수집 유체 ㎖당 적어도 1나노리터의 말초 폐액)를 생성한다. 샘플(115)은, 바람직하게는 연동 펌프로 되는 펌프(116)를 사용하여 분석 서브시스템(102)으로 이송될 수 있다. 밸브(116)는 예를 들어 샘플 수집 시스템(101)의 오염 제거 중에, 응축된 샘플(115)을 상기 분석 서브시스템(102) 또는 폐기물 용기로 보내는 데 사용될 수 있다. 약 1㎖ 미만의 EBA 샘플 유체의 양이 바람직하며 표적으로 설정된다. 예시적인 개시된 시스템은 약 100마이크로리터와 약 200마이크로리터 사이의 유체를 생성할 수 있다. 따라서, 여기에서 특정된 예시적인 EBA 샘플 포집 요소들 모두가 자율적 시스템용으로 개시된 예시적 샘플 수집 서브시스템(101)에 사용하는 데 있어 선호되는 것은 아니다. 예를 들어, BioSampler 및 Coriolis 에어로졸 샘플러는 EBA 에어로졸 입자를 부피가 10㎖를 초과하는 수성 샘플로 수집한다. 이렇게 큰 부피는 매우 희석된 샘플을 생성하므로 입자 농축 방법이 필요하다. 바람직한 에어로졸 포착 요소(108)라면, 심지어 기침을 하는 동안에는 재채기 호기 유속이 시간적으로 매우 불균일하지만, 호기에서 입자의 많은 부분을 동반하도록 하는 높은 유입 공기 유속을 가질 것이다. 유사하게, McDevitt의 습식 필름 임팩터는 임팩터 상류측의 증기 주입을 사용하고 이는 응축되어 50㎖ 원심분리기 튜브 내로 수집되며 그 다음 원심분리기를 사용하여 농축된다. 전술했듯이, 상기 예시적 EBA 샘플 수집 서브시스템은 약 1㎖ 이하인 액체 부피에 입자를 포착한다. 펠티에 장치를 사용하여 추출 요소(104)를 샘플 포착 요소(108)에 유체적으로 연결하는 냉각 배관(109)과 유사하게, 샘플 포착 요소(108)는 바람직하게는 하나 이상의 펠티에 냉각 장치(114)를 사용하여 냉각됨으로써 호기의 EBA 입자 크기가 성장할 수 있게 한다. 폐 깊숙이 형성된 크기 입자는 직경이 대략 100미크론 정도일 수 있지만 1미크론 넘게 성장할 수 있다. 샘플 포착 요소(108) 및 배관(109)의 냉각은 호기에서 액

체 샘플에도 수집되는 휘발성 화합물의 응축을 용이하게 한다. 따라서, 예시적인 EBA 포착 요소(108)는 호기에서 휘발성 및 비휘발성 바이오매스 모두를 수집한다. 사이클론이 포착 요소(108)로서 사용되는 경우, 사이클론 및 사이클론 입구 배관은 바람직하게는 구리, 니켈-구리 Alloy 400과 같은 구리 합금, 또는 높은 열전도율을 갖고 저렴한 비용의 기타 합금으로 제조된다. 또한, 구리 및 구리 합금은 고유한 항균 특성을 갖는다. 펠티에 냉각 장치(113, 114)는 사이클론 입구(109)와 사이클론(108) 본체의 온도를 제어할 수 있는 용이성과 정확성 때문에 냉각 장치로서 바람직하다. 샘플 포착 요소(108)(예를 들어, 상기 샘플 포착 요소(108)가 사이클론인 경우)로 공급되는 비말 동반 공기는 펌프(118)를 사용하여 공급되고 HEPA 필터(119)를 사용하여 여과될 수 있다.

[0033] EBA 샘플 분석 서브시스템(102)

[0034] EBA 에어로졸 입자를 포함하는 EBA 액체 샘플(115)은, EBA 입자를 분석하기 위한 진단 장치(121) 및 호기에서 휘발성 유기물을 분석하기 위한 장치(122) 중에서 적어도 하나를 사용하여 분석을 위해 샘플 처리 요소(120)로 보내어진다. 샘플 처리 요소(120)는 다음 단계들 중 하나 이상을 수행하는 데 필요한 요소를 포함할 수 있다:

[0035] (a) 샘플(115)은 컵이나 바이알 내에 위치될 수 있다. 예를 들어, 시리즈 110A 스팟 샘플러(Aerosol Devices)는 원형 웰 형상(75μL 웰 부피) 또는 눈물방울 웰 형상(120μL 웰 부피)의 32개 웰 플레이트를 사용하여 샘플 내의 초과 유체/액체를 가열하여 증발시킴으로써 상기 샘플을 농축한다.

[0036] (b) 샘플(115)을 컵에 넣고 진공 원에 노출시켜 상기 유체의 증발을 야기함으로써 상기 샘플을 농축한다.

[0037] (c) 샘플(115)은 상기 증발 과정을 가속화하도록 고 휘발성 용매(예컨대, 메탄올, 에탄올 및 아세토니트릴)와 혼합될 수 있다.

[0038] (d) 샘플(115)은 비드 기반 추출(bead-based extraction)을 거칠 수 있다. 비드 기반 추출은 희석 용액으로부터 바이오마커를 추출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 마이크론 크기의 자기 비드는 EBA 입자와 같은 단백질 바이오마커와 잘 결합하는 글리칸 물질로 코팅될 수 있다. 상기 비드는 진동 자기장에 의해 EBA 샘플과 밀접하게 혼합될 수 있다. 일정 기간 혼합한 후, 상기 비드를 일정한 자기장으로 일 측으로 끌어당긴 다음, 소량의 용매에 방출하여 농축된 샘플로서 EBA 입자를 추출할 수 있다.

[0039] (e) 샘플(115)은, 바이오마커(EBA 입자)가 비혼화성 유체로 우선적으로 전달되도록 상기 샘플을 비혼화성 유체와 밀접하게 접촉시키는, 용매 추출 공정을 거칠 수 있다. 예를 들어, 상대적으로 큰 수성 수집 유체 샘플(>1㎖)은 상대적으로 더 작은 양의 유기 용매(예컨대, 헥산 또는 클로로포름)와 접촉하여 상기 샘플의 EBA 입자 및 세포 단편으로부터의 지질을 상기 유기상으로 전달할 수 있다.

[0040] 많은 진단 장치가 분석 서브시스템(102)에서 사용하도록 조정될 수 있으며, 이는 게놈 기반 분석(예컨대, PCR, rt-PCR 및 전체 게놈 시퀀싱), 바이오마커 인식 분석(예컨대, ELISA) 및 스펙트럼 분석(예컨대, 질량 분석기(MS))을 수행하는 장치가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 이들 진단 장치 중에서, MS는 그의 분석 속도를 고려할 때 바람직하다. 바이오마커 식별에 바람직한 MS 기술은 전자분무 이온화(electrospray ionization: ESI) 및 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화(matrix assisted laser desorption ionization: MALDI) MS이다. ESI는 Oribtrap(ThermoFisher)과 같은 고분해능 질량 분석기에 결합될 수 있다. ESI-MS 장치는 일반적으로 매우 크고 무거우며 작동하는 데 높은 수준의 전문 지식이 필요하여, 자율적 작동이나 현장 진단과 같은 애플리케이션에는 적합하지 않다. 대조적으로, MALDI-MS 장치는 컴팩트하고 경량이며 100와트 미만의 전력을 소비하고 15분 이내에 샘플 분석을 제공할 수 있다. MALDI-MS는 ACF에 적합한 현장 진단에 선호되는 진단 장치이다. 시료 준비 시간을 포함하여 MS를 이용한 분석 시간은 약 15분 이내일 수 있다. 상기 샘플은 MALDI 분광계에 삽입하기 전에 건조되어야 하며, 큰(>1㎖) 샘플은 분석물 손실 또는 분해 없이는 빠르게 건조될 수가 없다. 농축된 샘플(115)을 사용하면, 상기 샘플로부터 물을 증발시키는 데 더 적은 시간이 필요하므로, MALDI MS를 사용하는 시료 분석은 5분 미만일 수 있다(상기 샘플 준비를 포함하여).

[0041] "매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화"(MALDI)에서, 큰 분자는 질량 분석기를 사용하여 그대로 분석할 수 있다. 이 기술에서, 표적 입자(분석물)는 매트릭스 화학 물질(matrix chemical)로 코팅되어 레이저의 광(종종 자외선 파장)을 우선적으로 흡수한다. 상기 매트릭스가 없으면, 생물학적 분자는 질량 분석기에서 레이저 빔에 노출될 때 열분해에 의해 분해된다. 상기 매트릭스 화학 물질은 또한 기화된 분자에 전하를 전달하여 이온을 생성한 다음, 이들 이온은 전계에 의해 비행관(flight tube) 아래로 가속된다. 미생물학 및 단백질체학은 질량 분석의 주요 응용 분야가 되었다; 예컨대, 박테리아 식별, 화학 구조 발견, 단백질 기능 도출. MALDI-MS는 조류(algae)의 지질 프로파일링에도 사용되었다. MALDI-MS 동안, 일반적으로 트리플루오로아세트산(tri-fluoro-acetic acid: TFA)과 같은 산과 알파-시아노-4-하이드록시신남산(alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)과 같은 MALDI 매트릭

스 화학물질로 구성된 액체가 용매에 용해되어 상기 샘플에 추가된다. 용매에는 아세토니트릴, 물, 에탄올 및 아세톤이 포함된다. TFA는 일반적으로 상기 샘플의 질량 스펙트럼에 대한 염 불순물의 영향을 억제하도록 추가된다. 물은 친수성 단백질을 용해시키고, 아세토니트릴은 소수성 단백질을 용해시킨다. MALDI 매트릭스 용액은 MALDI 플레이트 상의 샘플에 스폿팅되어 샘플 상에 MALDI 매트릭스 재료의 균일한 균질층을 생성한다. 상기 용매가 증발하면, 매트릭스 결정을 통해 샘플이 퍼진 재결정화된 매트릭스만 남는다. 상기 산은 상기 샘플의 세포막을 부분적으로 분해하여 단백질을 MS에서 이온화 및 분석에 사용가능하게 만든다. 다른 MALDI 매트릭스 물질로는, 3,5-디메톡시-4-히드록시신남산(시나핀산)(3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid)), α-시아노-4-히드록시 신남산(α-시아노 또는 α-매트릭스)(a-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (a-cyano or a-matrix)) 및 2,5-디히드록시벤조산(2,5-dihydroxybenzoic acid: DHB)이 포함된다(미국 특허 제 8,409,870호 참조).

[0042] 예시적 시스템(100)에서, 포착 요소(108) 및 입구 라인(109)을 냉각시키기 위한 냉각기의 사용은 호기 중의 응축된 휘발성 유기 화합물을 포함하는 샘플(115)과 EBA를 포함하는 냉각된 액체 샘플을 생성한다. 따라서, 샘플(115)은 응축된 휘발성 유기물을 분석하기 위해 진단 장치(122)로, 그리고 비휘발성 EBA 입자를 분석하기 위해 진단 장치(121)로 라우팅될 수 있다. 단계 204(도 5)의 샘플 처리 동안, 상기 액체 샘플(115)은 히터를 사용하여 가온될 수 있고, 상기 휘발성 화합물을 GC-MS, GC-IMS, 휘발성 이온 크로마토그래피, 또는 휘발성 유기 화합물 분석에 적합한 임의의 다른 유형의 분석방법과 같은 진단 장치(122) 내로 구동할 수 있다. 도 4는 호기로부터의 이온 크로마토그램이 건강한 개인과 TB 감염 환자를 구별하는 데 사용될 수 있음을 보인다. Hashoul(2019)은 호기로부터 TB를 포함한 폐질환을 검출하기 위한 센서의 사용을 개시한다(Dina Hashoul and Hossam Haick, "Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath", Eur. Respir. Rev. 2019; 28: 190011). Hashoul은 GC(가스 크로마토그래피)-MS를 사용한 226명의 증상 있는 고위험 환자의 호흡 분석을 설명하면서 활동성 폐결핵의 여러 바이오마커를 지적해냈다. 이들은 알칸 및 알칸 유도체와 같은 산화 스트레스 생성물의 바이오마커와 시클로헥산 및 벤젠 유도체와 같은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)의 휘발성 대사 산물을 제안했다. 이들의 결과는 C-통계 값을 사용하여 85%의 전체 정확도, 84%의 민감도 및 64.7%의 특이도로 양성 및 음성 TB를 구분했다. 금속 산화물 센서가 사용되었다. 또한, 상기 센서 어레이는 TB 환자와 건강한 대조군을 구별하는 데 93.5%의 민감도와 85.3%의 특이도를 보였고, 전체 테스트 모집단에서 TB 환자를 식별하는 데 76.5%의 민감도와 87.2%의 특이도를 보였다. 금 나노 입자(gold nanoparticle: GNP)와 QMB(quartz microbalance sensor: 석영 미량천칭 센서)의 사용에 대해서도 기술했다. 참조문헌 섹션에 인용된 Hashoul에 의해 출간된 비특허 문헌은 전체가 여기에 통합된다. 전술한 서브시스템(101)에서 냉각이 사용되지 않는 경우, 액체 샘플(115)은 응축된 휘발성 유기물을 포함하지 않을 수 있다. 결과적으로, 진단 장치는 진단 장치(121)를 사용하는 액체 내의 EBA 입자 분석에 한정될 수 있다.

[0043] 도 5는 전술한 예시적 시스템(100)을 사용하는 예시적 진단 방법(200)의 개략도이다. 예시적 방법(200)은 호기에 기반하여 자율적 현장 진료 진단을 수행하는데 사용될 수 있다. 단계(201)에서, 개인(105)은 앉도록 지시받을 수 있고, 의자는 선택적으로 차폐 부스(106) 내에 위치할 수 있다. 단계(202)에서, 추출 요소(104)는 개인의 머리에 제거가능하게 장착될 수 있거나 상기 머리보다 큰 콘(cone)이 개인의 머리 주위에 느슨하게 맞도록 위치될 수 있다. 샘플 포착 요소(108)가 활성화되어 공기가 환자의 머리 주위로 그리고 상기 샘플 포집 장치 내로 유입된다. 사이클론이 샘플 포착 요소(108)로서 사용되는 경우, 샘플 포착 요소(108)로의 기류와 사이클론 본체 및 입구 배관(109)의 냉각이 개시된다. 바람직하게는, 여과된 시스 공기(sheath air)가 추출 요소(104)에 공급된다. 시스 공기는 바람직하게는 90% 초과의 상대 습도로 가습될 수 있다. 그 다음, 개인(105)은 사전 설정된 반복 횟수를 포함할 수 있는 하나 이상의 사전 결정된 기동(203)을 수행하도록 지시받는다. 상기 기동에는 하기도로부터 EBA 샘플을 생성하기 위한 하나 이상의 FVC 또는 변형된 FVC 기동을 수행하고, 상기도로부터 주로 EBA를 생성하기 위한 하나 이상의 기침 샘플을 생성하고, 비강/상기도로부터 주로 EBA를 생성하기 위한 하나 이상의 재채기 샘플을 생성하는 것이 포함될 수 있다. 변형된 FVC는 앞서 깊은 숨을 내쉬고 5~10초 동안 일시 중지하는 FVC이다. 이렇게 숨을 내쉬고 일시 중지하면 세기관지가 닫히고 FVC 들숨 중에 다시 열린다. 폐포를 포함한 작은 폐 통로의 폐쇄 및 재개는 입자 생성을 증가시키는 것으로 여겨진다. 예시적 시스템(100)을 사용한 TB 진단의 경우, 약 3번 내지 약 5번의 변형된 FCV 반복이 필요할 수 있다. 기동에는 기침, FVC 호흡, 변형된 FVC 호흡 및 재채기가 포함될 수 있다. 일부 다른 질병의 진단을 위해서는 모든 기동이 필요할 수 있다. 재채기는 소량의 후추나 에어로졸 형태의 기타 향신료를 비강에 주입하여 유발할 수 있다. 바람직하게는, 하기도를 샘플링하기 위한 적어도 3개의 변형된 FVC 호흡과 상기도 샘플링을 위한 일련의 기침이 필요할 수 있다. 상기 하기도는 일반적으로 기관, 폐 및 기관지의 모든 부분(폐포 포함)을 포함하며 상기 하기도의 기관은 흉강 내부에 위치한다. 상기 상기도는 일반적으로 코, 인두 및 후두를 포함하며, 상기 상기도의 기관은 흉강 외부에 위치한다.

일부 경우에는 최소한 10개의 변형된 FVC 호흡이 필요할 수 있다. 비강을 샘플링하기 위해 일련의 재채기를 유도할 수 있다. 호흡당 바이오매스 수집을 증가시키는 바람직한 변형된 FVC는 Bake 등(2019)의 참조문헌 섹션에 인용된 비특허 문헌이며, 그 전체가 여기에 참조로 포함된다. 바람직한 호흡 기동은 10회의 기침/FVC/기관지 블래스트(bronchial blast)를 포함할 수 있다. 콘이나 쉬라우드 대신에, 샘플 추출 요소(104)는 수면 무호흡증 치료에 사용되는 CPAP(continuous positive airway pressure) 마스크(예컨대, Philips Respironics에서 판매하는 Dreamware and Amara 마스크)를 포함할 수 있다. CPAP는 마스크를 통해 인후로 공기를 불어넣어 인후의 기압을 민감하게 증가시키고 기도가 좁아지는 것을 방지하지만 공기의 흐름을 시스 유체로서 사용하여 다양한 호흡 기동에서 호기(날숨)를 수집하도록 변형된다.

[0044] 그런 다음, 환자는 의자에서 나와 대기실에 앉아있으라는 지시를 받는다. 상기 추출 요소(104)는 UV 광에 소독될 수 있다. 샘플 처리 단계(204)에서 샘플(115)은 분석 서브시스템(102)에서의 샘플 처리를 위해 수집 서브시스템(101)으로부터 자동으로 전송된다. 샘플 처리의 유형은 진단 장치의 유형에 따라 다르다. 진단 장치가 MALDI-MS인 경우, 샘플 처리는, 연동 펌프를 사용하여 샘플(115)을 MALDI-MS 샘플 디스크 상으로 플레이팅하는 단계, 상기 디스크를 가열하여 상기 샘플을 농축하는 단계, MALDI 매트릭스/산/용매(하기 설명)를 부가하고 디스크를 건조하는 단계를 포함할 수 있다. 그런 다음, 상기 샘플 디스크는 단계(205)에서 MALDI-MS를 사용하여 분석된다. 획득된 스펙트럼은 특정 호흡기 감염에 대해 양성으로 알려진 샘플의 스펙트럼과 또한 건강한 것으로 알려진 환자로부터의 샘플 스펙트럼과 비교되고, 상기 환자의 진단이 생성된다. 그러면, 그 결과는 임상의나 환자에게 전달될 수 있다. 일단 추출 요소(204)가 환자에게 부착되고 샘플 추출이 개시되면, 예시적인 방법은 필요한 기동을 수행한 후 자율적이며(상기 환자에게 의자에서 떠나도록 요청하는 것을 제외하고) 진단의 테스트 결과를 생성한다.

[0045] 단계(203)에서의 FVC 기동에 관하여, 도 6a~c는 FVC 호흡 기동의 10회 반복에 대한 건강한 개인의 호흡 에어로졸의 정상적인 변동성을 보인다. 건강한 개인의 경우에도, 호기 에어로졸의 양과 입자 크기 분포의 변동성은 매우 크다. LASEX II(PMS, City, CO)를 사용하여 데이터를 캡처했다. 기침 기동에서 EBA를 수집하는 동안에도 유사한 변동성이 나타났다. 입자 크기 분포는 시간 경과에 따른 입자 크기 분포를 통합하여 호기된 총 입자 질량을 결정하는 데 도움이 된다. 이러한 측면은 수집된 샘플이 분석에 충분한지 여부를 결정하는 데 도움을 준다. 도 7은 세기관지 막 파열(bronchiole film burst: BB), FCV 및 기침 기동 동안 호기에서의 이산화탄소 측정치를 보인다. Patterson 등에 의해 CO_2 생성 속도와 에어로졸 입자 생성 간에 강한 상관관계가 관찰되었다(Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood, “Detection of Mycobacterium tuberculosis bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients,” Gates Open Research 2018, 1:11). 측정된 CO_2는 Wood 등에 의해 기술된 바 있듯이 호기량을 계산하는 데 사용할 수도 있다.

[0046] 도 8은 LASEX 기기에 의해 측정된 입자 크기 분포 및 입자 농도에 기반한 호기 유체 부피의 부피(나노리터)를 나타낸다. 만일 선호되는 방법이 가장 큰 샘플을 제공하는 방법인 경우, 변형된 FVC 기동이 표준 FVC보다 선호된다. 기침은 주로 상부 호흡기에서 유사한 양의 EBA 샘플량을 제공한다. 이들 방법 둘 다는 달리 감염된 것으로 알려졌지만 아직 치료를 받고 있지 않은 환자의 TB 감염을 감지하기에 충분한 샘플을 생성한다.

[0047] 호기에서 TB 감염에 대한 바이오마커를 검출하기 위한 MS의 사용과 관련하여, 1000개의 특징을 포함하는 양이온 및 음이온 신호가 TB 환자에서 수집된 샘플(n=20)과 비-TB/대조군 샘플(n=13)로부터 고해상도 Orbitrap 질량 분석기(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 획득(또는 추출)되었다. 5:1 신호 대 잡음비(SNR) 초과의 질량이 선택되었다. 무감독 차원 축소 알고리즘(unsupervised dimensionality-reduction algorithm)인 가중 주성분 분석(weighted principal component analysis: PCA)을 사용하여 큰 신호 세트를 2개 요소로 줄였다. PCA는 2D 시각화를 제공하였고 이는 추출된 신호가 TB와 비-TB의 두 샘플 클래스 간의 본질적인 차이를 나타낼지 여부를 조사하는 데 사용되었다. PCA 결과(도 9)는 각 그룹의 샘플이 함께 클러스터링되는 경향이 있는 것으로 나타났으며, 이는 고해상도 질량 분석으로부터 수집된 추출 신호들을 사용하여 두 클래스의 샘플들 간을 구별할 수 있음을 시사한다.

[0048] 본 명세서에 기술된 예시적인 시스템 및 방법은 호흡기 감염에 대한 진단 능력에서 반드시 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 폐암은 또한 바이오마커를 말초 폐액 내로 방출할 수 있으며, 이들 바이오마커는 개시된 시스템 및 방법에 의해 쉽게 검출될 것이다. 또한, 혈액은 폐 내의 폐포 내막과 밀접하게 접촉하게 되기 때문에, 신체의 다른 부분(폐 너머)에 있는 감염 및 암의 바이오마커가 상기 폐포 내막을 통해 말초 폐액 내로 전이될 수 있고 따라서 EBA의 분석에 의해 검출된다. 결과적으로, 본 발명의 범위는 호흡기 질환의 검출 및 진단에 제한되지

않는다.

[0049] 일 예시적 샘플 추출 요소는 호기 중에 EBA 입자를 포함하는 비휘발성 유기 성분을 선택적으로 포착하도록 충전층 컬럼(packed bed column)을 포함할 수 있다. 호기 중의 비휘발성 성분은 미생물, 바이러스, 대사산물 바이오마커, 지질 바이오마커, 및 상기 호흡기 질환의 특징인 단백질체 바이오마커 중의 적어도 하나를 포함하는 호흡 에어로졸 입자를 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 수지, 셀룰로오스, 실리카, 아가로스, 및 수화 Fe_3O_4 나노입자 중의 적어도 하나를 포함하는 고체 입자를 포함할 수 있다. 상기 충전층 컬럼은 표면에 옥타데실 아크릴레이트(octadecyl acrylate)(Cl 8) 작용기를 갖는 수지 비드(resin bead)를 포함할 수 있다. 상기 수지 비드는 약 12㎛ 내지 약 20㎛의 공칭 직경을 가질 수 있다. 상기 고체 입자는 입자 표면에 고정화된 작용기를 포함할 수 있으며, 이때 상기 작용기는, Cl 8(옥타데실), 옥틸, 에틸, 시클로헥실, 페닐, 시아노프로필, 아미노프로필,2,3-디히드록시프로폭시프로필, 트리메틸-아미노프로필, 카르복시프로필, 벤젠술폰산, 프로필술폰산, 이온교환 상, 중합체 상, 항체, 글리칸, 지질, DNA 및 RNA 중의 적어도 하나를 포함한다. 상기 이온교환 상은, 디에틸아미노에틸 셀룰로오스, QAE 세파덱스(QAE Sephadex), Q 세파로스, 및 카르복시메틸 셀룰로오스 중의 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 중합체 상은, 폴리스티렌-co-1,4-디비닐벤젠, 메타크릴레이트, 폴리비닐 알코올, 전분 및 아가로스 중의 적어도 하나를 포함한다. 상기 항체는, 항-인간 알부민, 항-인플루엔자 A 바이러스 NP 및 항-SARS-CoV-2 바이러스 중의 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 항체는 단백질 A/G 아가로스 비드 상에 고정될 수 있다. 상기 포착 요소는 주변 온도 이하의 온도로 냉각될 수 있다. 공동 소유의 미국 가특허출원 제63/069,029호 "호기 및 에어로졸 분석을 사용한 호흡기 질환의 진단"에서는 충전층 컬럼을 포함하는 예시적인 샘플 추출 요소와 관련된 추가 세부사항을 제공하고 그 전체가 참고로 여기에 포함된다.

[0050] 본 명세서에 개시된 예시적인 시스템 및 방법은 로봇 시스템 및 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 시스템 및 방법에는, 샘플 플레이트 상에 수집된 샘플을 스폿팅하고 추가 처리 또는 샘플 처리, 그리고 처리된 샘플의 분석을 수행하는 로봇식 샘플 전달 시스템이 포함될 수 있다. 공동 소유의 미국 가특허출원 제62/931,200호 "에어로졸 입자의 신속하고 자율적인 검출의 시스템 및 방법"에서는 그 전체가 여기에 참조로 포함되는 예시적인 로봇 샘플 전달 시스템과 관련된 추가 세부사항을 제공한다.

[0051] 수집된 샘플은 처리 및 분석 전에 샘플 플레이트에 스폿팅될 필요가 없다. 예를 들어, 수집된 액체 샘플에서의 EBA 입자는 분무기를 사용하여 에어로졸화되고 MALDI 매트릭스를 사용하여 "즉석에서(on-the-fly)" 코팅되어 코팅된 에어로졸 EBA 입자를 형성할 수 있다. 상기 코팅된 입자는 에어로졸 비행시간 질량 분석기(aerosol time of flight mass spectrometry: ATOFMS)를 사용하여 분석할 수 있다. "즉석에서"는 에어로졸을 포함하는 입자가 코팅 공정의 한 단계로서 표면상으로(예컨대, MALDI 플레이트의 표면상으로) 또는 액체 내로 수집되지 않음을 의미한다. 공동 소유의 가특허출원 제15/755063호 "음향 코팅기를 사용한 에어로졸 입자의 코팅"은 추가 세부사항을 제공하고 그 전체가 여기에 참조로서 포함된다.

[0052] 요약서는 37 C.F.R. §1.72(b)에 따라 독자로 하여금 피상적인 검토로부터 기술 개시내용의 본질과 요지를 신속하게 결정할 수 있도록 한다. 이는 특허청구범위의 범위나 의미를 해석하거나 제한하는 데 사용되어서는 안 된다.

[0053] 본 개시내용이 이를 실시하는 바람직한 형태와 관련하여 설명되었지만, 통상의 기술자는 본 개시의 정신을 벗어남이 없이 많은 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 개시내용의 범위가 위의 설명에 의해 어떤 방식으로든 제한되는 것으로 의도되지 않는 것이다.

[0054] 또한, 본 개시내용의 본질을 벗어남이 없이 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변경들도 본 발명의 상세한 설명에 암시적으로 포함되는 것이다. 이것들은 여전히 본 개시내용의 범위에 속한다. 본 개시내용은 독립적으로 그리고 전체 시스템으로서, 그리고 방법 유형 및 장치 유형 모두에서, 본 개시내용의 다양한 측면을 포괄하는 특허를 산출하도록 의도된 것으로 이해되어야 한다.

[0055] 또한, 본 개시내용 및 특허청구범위의 다양한 요소들 각각은 또한 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 본 개시내용은 임의의 장치 구현, 방법 구현 또는 프로세스 구현의 구현의 변형이든 간에, 또는 심지어 이들 중 단지 임의의 요소의 변형이든 간에, 이러한 각각의 변형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0056] 특히, 각 요소에 대한 단어는 기능 또는 결과만 동일하더라도 등가의 장치 용어 또는 방법 용어로 표현될 수 있음을 이해해야 한다. 이와 같은 동등하거나 더 광범위하거나 훨씬 더 일반적인 용어는 각 요소 또는 작용의 설명에 포함되는 것으로 간주되어야 한다. 이러한 용어는 본 개시내용의 권리가 주어지는 묵시적으로 광범위한 범위를 명시하기 위해 원하는 경우 대체될 수 있다. 모든 작용은 그 작용을 취하기 위한 수단으로 또는 그 작용을

유발하는 요소로 표현될 수 있음을 이해해야 한다. 유사하게, 개시된 각각의 물리적 요소는 그 물리적 요소가 용이하게 하는 작용의 개시를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0057] 또한, 사용된 각 용어와 관련하여, 본 출원에서의 그 활용이 그러한 해석과 불일치하지 않는 한, 일반적인 사전적 정의는, 장인들에 의해 인정된 최신 기술사전들 중의 적어도 하나에 포함되어 있는 바와 같은, 각 용어 및 모든 정의, 대체 용어와 동의어에 대해 통합된 것으로 이해되어야 하고, Random House Webster의 Unabridged Dictionary(최신판)이 참조로 여기에 포함된다.

[0058] 또한, 전환부 "포함하는(comprising)"의 사용은 전통적인 청구항 해석에 따라 여기서는 "개방형" 청구항을 유지하는 데 사용된다. 따라서, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 요소나 단계, 또는 요소들 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 의미하지만 다른 요소나 단계, 또는 요소들 또는 단계들의 그룹을 배제하지 않도록 의도된 것임이 이해되어야 한다. 이러한 용어는 법적으로 허용되는 가장 광범위한 범위를 본 출원인에게 제공하도록 가장 광범위한 형태로 해석되어야 한다.

[0059] 참조문헌

[0060] 1. E B. Bake, P. Larsson, G. Ljungkvist, E. Ljungstrom, and A-C Olin, "Exhaled particles and small airways", Respiratory Research (2019) 20:8.

[0061] 2. Fennelly K.P., Martyny J.W., Fulton K.E., Orme FM., Cave D.M., et al. (2004) Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis: a new method to study infectiousness. Am J Respir Crit Care Med 169: 604-609.

[0062] 3. Dina Hashoul and Hossam Haick, "Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath", Eur. Respir. Rev. 2019; 28: 190011.

[0063] 4. Hunt, J., "Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease", J. Allergy Clin. Immunol. 2002; 110:28-34.

[0064] 5. Maria D. King, Andrew R. McFarland, "Bioaerosol Sampling with a Wetted Wall Cyclone: Cell Culturability and DNA Integrity of Escherichia coli Bacteria", Aerosol Sci. Technok, 46:82-93, 2012.

[0065] 6. James J. McDevitt, Petros Koutrakis, Stephen T. Ferguson, Jack M. Wolfson, M. Patricia Fabian, Marco Martins, Jovan Pantelic, and Donald K. Milton, "Development and Performance Evaluation of an Exhaled-Breath Bioaerosol Collector for Influenza Virus", Aerosol Sci. Technol. 2013 January 1; 47(4): 444-451.

[0066] 7. Benjamin Patterson, Carl Morrow, Vinayak Singh, Atica Moosa, Melitta Gqada, Jeremy Woodward, Valerie Mizrahi, Wayne Bryden, Charles Call, Shwetak Patel, Digby Warner, Robin Wood, "Detection of Mycobacterium tuberculosis bacilli in bio-aerosols from untreated TB patients", Gates Open Research 2018, 1:11.

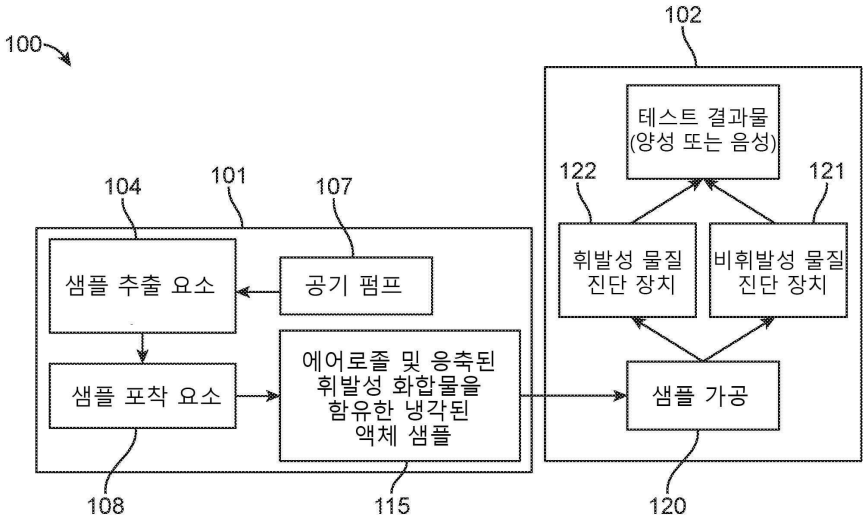
[0067] 8. Wood R., Morrow C., Barry C.E., III, Bryden W.A., Call C.J., Hickey A.J., et al. : Real-Time Investigation of Tuberculosis Transmission: Developing the Respiratory Aerosol Sampling Chamber (RASC). PLoS One. 2016; 11(1): e0146658.

[0068] 9. Rachel C. Wood, Angelique K. Luabeya, Kris M. Weigel, Alicia K. Wilbur, Lisa Jones-Engel, Mark Hatherill, and Gerard A. Cangelosi, "Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients", Sci. Rep. 5, 8668 (2015).

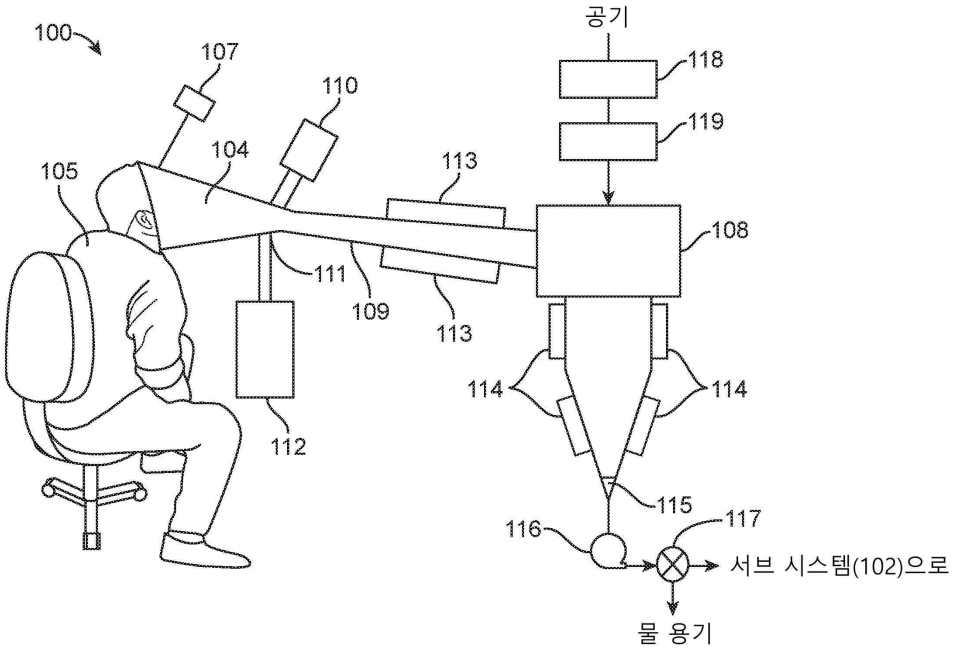
[0069] 10. Fatima B. Wurie, Stephen D. Lawn, Helen Booth, Pam Sonnenberg, Andrew C. Hayward, "Bioaerosol production by patients with tuberculosis during normal tidal breathing: implications for transmission risk", Thorax 2016; 71: 549-554.

도면

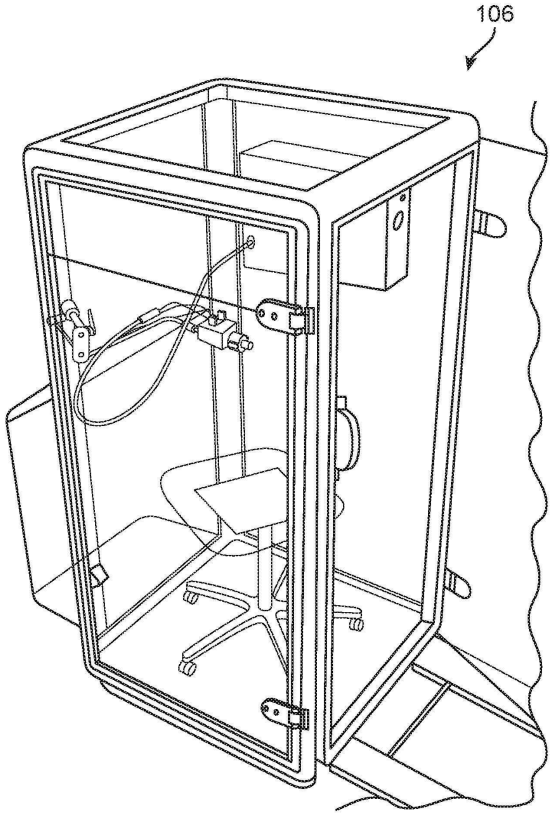
도면1


100
102
테스트 결과물
(양성 또는 음성)
104
101
107
122
121
샘플 추출 요소
공기 펌프
휘발성 물질
진단 장치
비휘발성 물질
진단 장치
샘플 포착 요소
에어로졸 및 응축된
휘발성 화합물을
함유한 냉각된
액체 샘플
샘플 가공
108
115
120

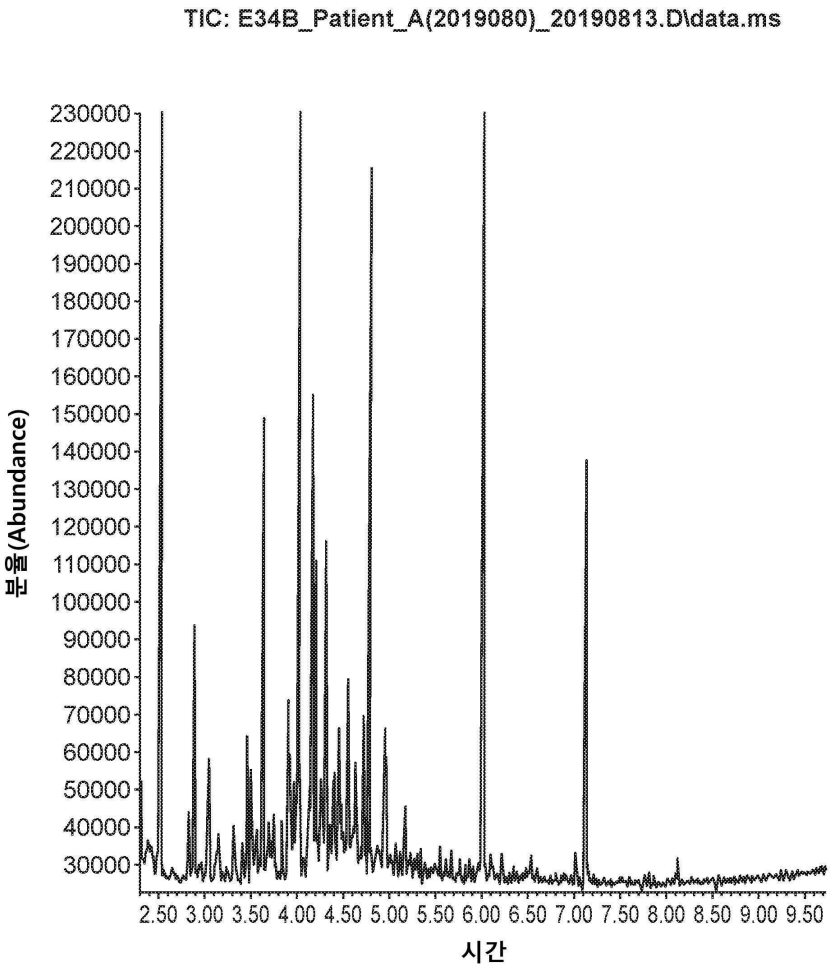
도면2


100
공기
107
110
118
119
104
105
113
108
111
109
113
114
114
112
115
116
117
서브 시스템(102)으로
물 용기

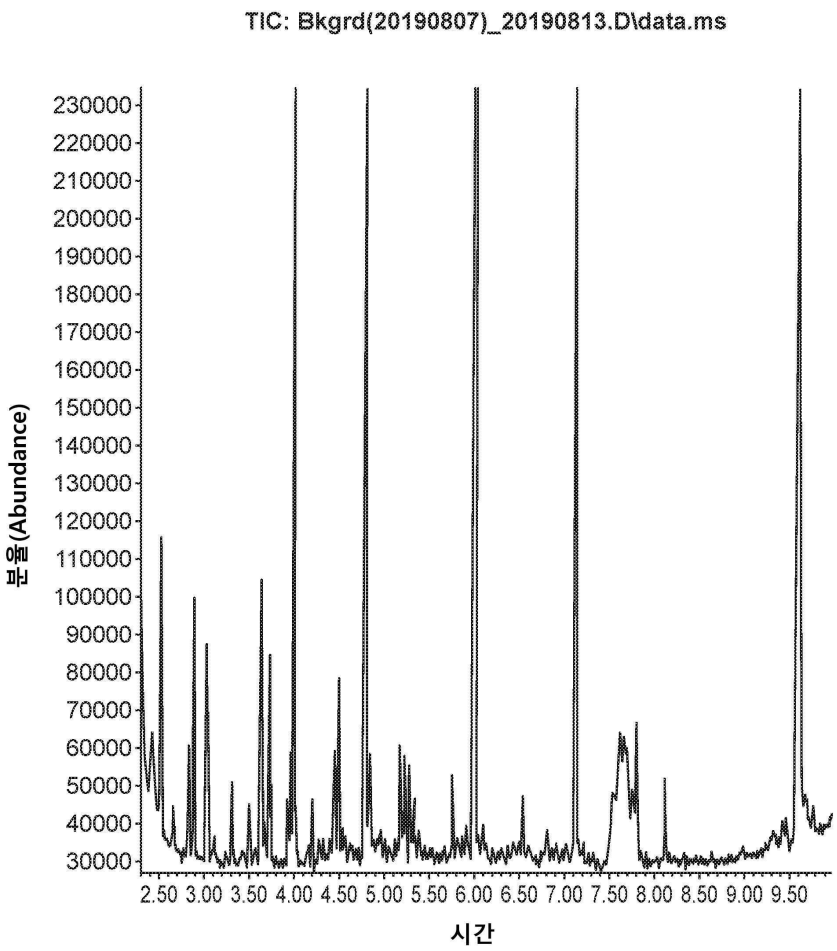
도면3



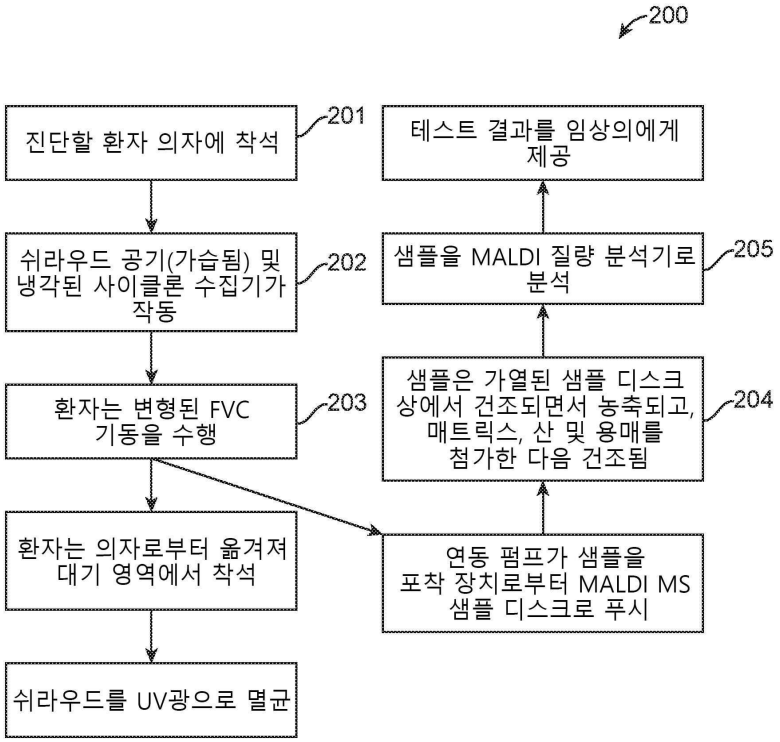
도면4a


TIC: E34B_Patient_A(2019080)_20190813.D\data.ms
분율(Abundance)
230000
220000
210000
200000
190000
180000
170000
160000
150000
140000
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 8.50 9.00 9.50
시간

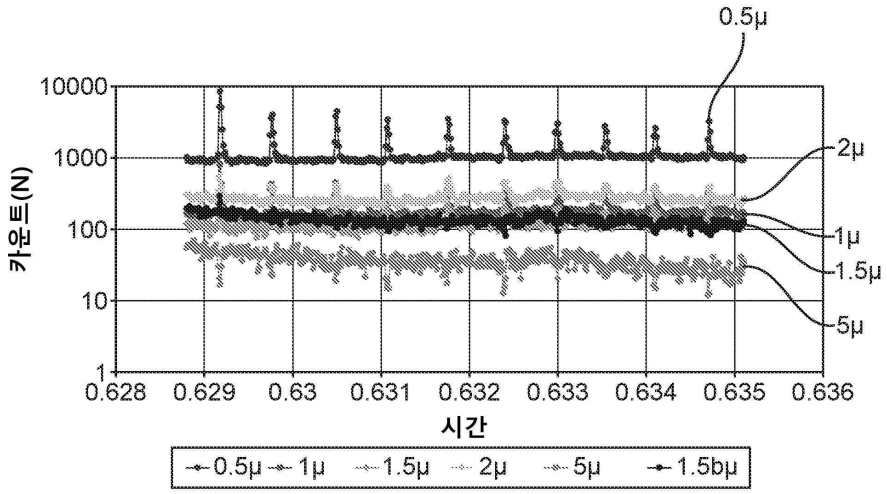
도면4b


TIC: Bkgrd(20190807)_20190813.D\data.ms
분율(Abundance)
230000
220000
210000
200000
190000
180000
170000
160000
150000
140000
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 8.50 9.00 9.50
시간

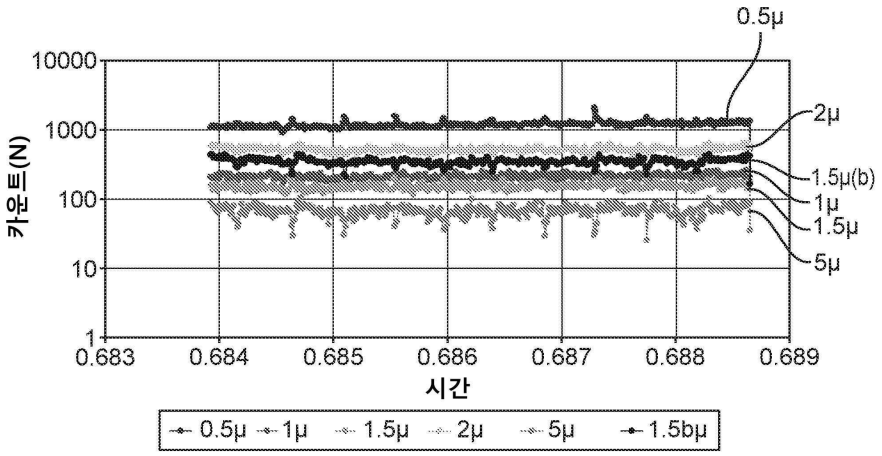
도면5


200
진단할 환자 의자에 착석
201
쉬라우드 공기(가습됨) 및 냉각된 사이클론 수집기가 작동
202
환자는 변형된 FVC 기동을 수행
203
환자는 의자로부터 옮겨져 대기 영역에서 착석
쉬라우드를 UV광으로 멸균
연동 펌프가 샘플을 포착 장치로부터 MALDI MS 샘플 디스크로 푸시
샘플은 가열된 샘플 디스크 상에서 건조되면서 농축되고, 매트릭스, 산 및 용매를 첨가한 다음 건조됨
204
샘플을 MALDI 질량 분석기로 분석
205
테스트 결과를 임상의에게 제공

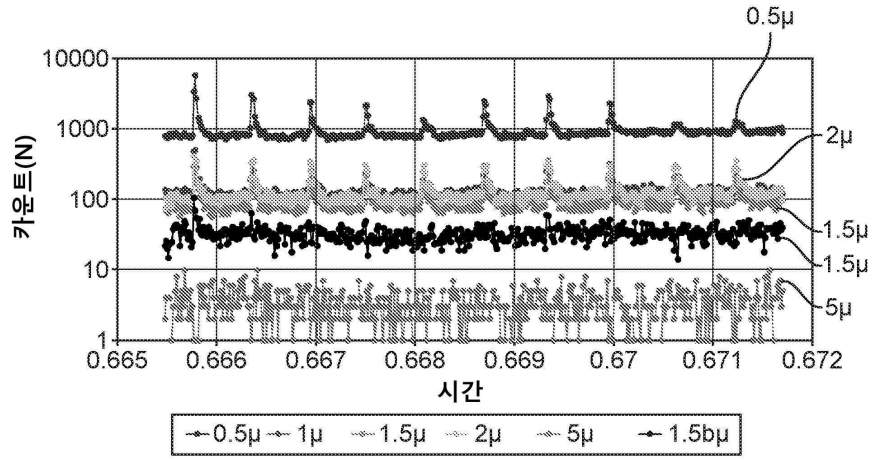
도면6a


0.5μ
2μ
1μ
1.5μ
5μ
10000
1000
100
10
1
카운트(N)
0.628
0.629
0.63
0.631
0.632
0.633
0.634
0.635
0.636
시간
0.5μ
1μ
1.5μ
2μ
5μ
1.5bμ

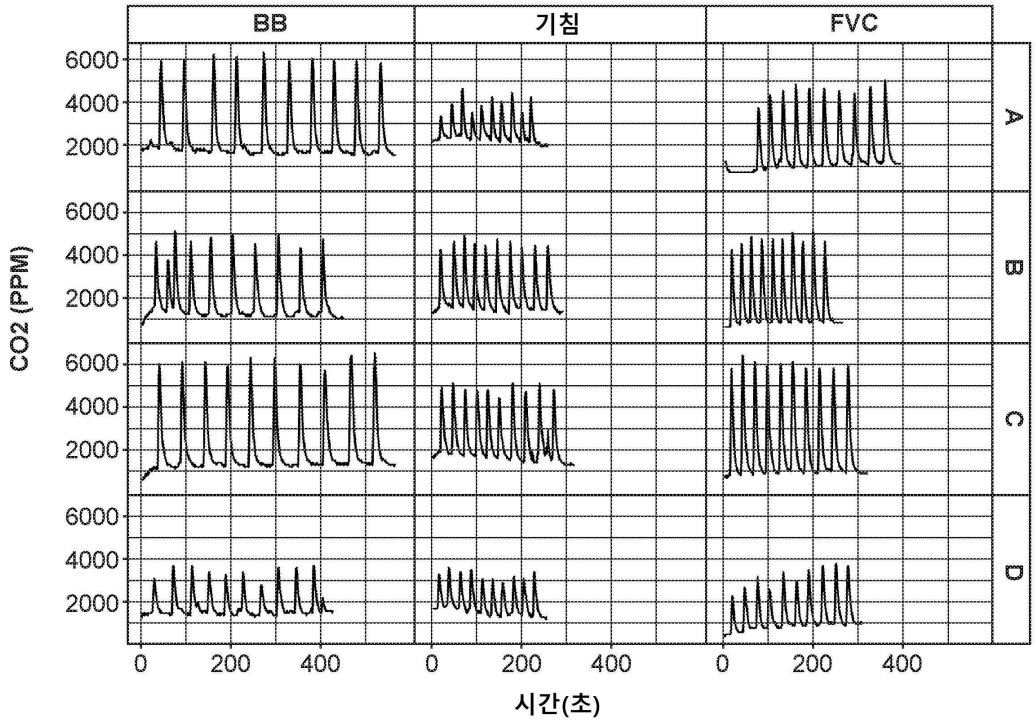
도면6b


0.5μ
2μ
1.5μ(b)
1μ
1.5μ
5μ
10000
1000
100
10
1
카운트(N)
0.683
0.684
0.685
0.686
0.687
0.688
0.689
시간
0.5μ
1μ
1.5μ
2μ
5μ
1.5bμ

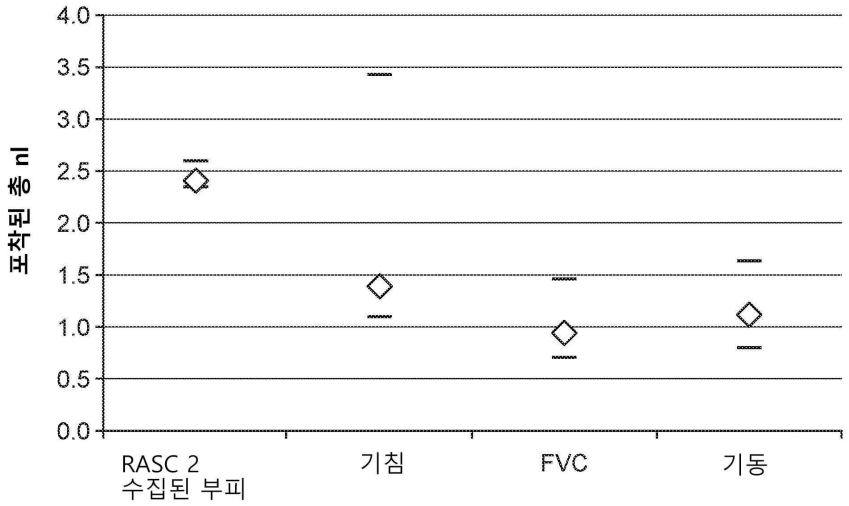
도면6c


0.5μ
2μ
1.5μ
1.5μ
5μ
10000
1000
100
10
1
카운트(N)
0.665
0.666
0.667
0.668
0.669
0.67
0.671
0.672
시간
0.5μ
1μ
1.5μ
2μ
5μ
1.5bμ

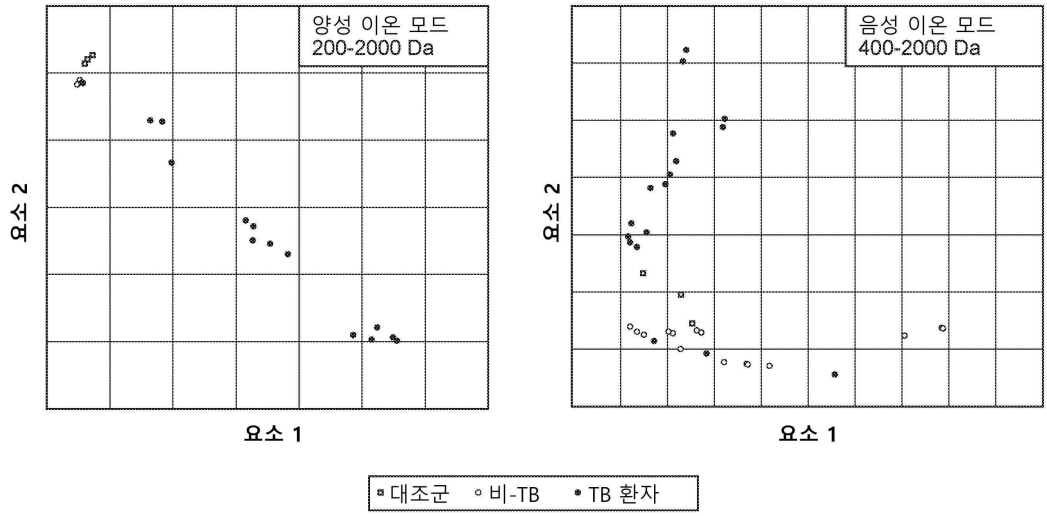
도면7


BB
기침
FVC
A
B
C
D
CO2 (PPM)
6000
4000
2000
0
200
400
시간(초)

도면8


포착된 총 nl
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
RASC 2
수집된 부피
기침
FVC
기동

도면9


양성 이온 모드
200-2000 Da
음성 이온 모드
400-2000 Da
요소 2
요소 1
요소 2
요소 1
대조군
비-TB
TB 환자