

Intestinal Microflora and Atopy Development in Infants during the First Nine Months

Jae-Seok Kim¹, Tae-Jung Sung², Hong Kyu Park², Ji Young Park¹, Hyoun Chan Cho¹,
Il Tae Hwang², Hae-Ran Lee²

Departments of ¹Laboratory Medicine, ²Pediatrics, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The intestinal microflora varies according to the factors such as age, diet and environment. It is debated whether the changes of microbiota after birth are associated with atopic disease. The purpose of this study was to investigate colonization rates of some intestinal microflora during the initial 9 months after birth, and their association with the development of atopy.

Methods: Stool specimens were collected at 1, 3, 7 days and at 1, 2, 4, 6, 9 months after birth, and *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus* were cultured with selective media. Diagnosis for atopy was accomplished via clinical history of atopy, serum total IgE, and skin prick test.

Results: By 12 months of age, among 48 infants, 36 (75.0%) were non-atopic while 12 (25.0%) had developed atopy. Although not statistically significant, the intestinal microflora of infants with atopy vs. non-atopy was characterized by being less often colonized

with *E. coli* (12.5% vs. 52.4%; $P=0.093$) and *S. aureus* (0% vs. 38.1%; $P=0.066$) at three days after birth. Colonization rates of *E. coli* reached 50% after 3 days of birth in non-atopy group whereas this rate was not achieved until after 1 month in the atopy group.

Conclusion: The intestinal colonization rates of bacteria in this study were not statistically different between atopy and non-atopy groups. Rapid colonization of *E. coli* and *S. aureus* was observed within 1 week after birth in the non-atopy group. The exact association between atopy and the bacterial colonization and/or diversity in the early days after birth has yet to be determined. (**Ann Clin Microbiol 2014; 17:73-79**)

Key Words: Atopy, Colonization, Infant, Intestinal flora, Microbiota

INTRODUCTION

출생 후 신생아는 산도 주변이나 환경에 존재하는 다양한 세균에 노출되며, 세균의 정착이 진행되고, 출생 직후부터 신생아의 피부와 호흡기 등에서 세균이 분리된다. 그 중 일부 균종은 장내에 정착하여 사람과 세균의 공생관계가 지속되게 된다. 장내 세균총은 신생아의 유전적 성향, 분만방법, 장내 정착 시기, 항생제 치료, 감염증, 위생, 나이 등 여러 요인에 의해 다른 양상을 보이는 것으로 알려져 있다[1]. 장내의 세균 수는 10-100 조로 추정되며[1], 1,000-1,150개의 다양한 균종이 분리되나, 한 사람의 장내에는 160 균종이 우세균종으로 존재한다고 알려져 있다[2].

장은 음식이나 장내 세균 같은 다양한 항원의 자극이 발생하

는 곳으로 gut-associated lymphoid tissue (GALT)라는 인체에서 가장 큰 면역기관이기도 하다. 또한, 이러한 장내의 세균의 분포나 차이가 아토피에 관여할 것으로 추정하고 있다[3]. 지금까지 많은 연구에서 장내 세균총의 구성과 아토피의 연관성이 있음을 제시했지만, 아토피를 예방하거나 유발할 수 있는 특정 세균을 밝히지는 못하였다[3-5].

출생 직후부터 다양한 세균에 노출된 신생아에서는 면역 조절 기능이 발달한다는 가설도 있으며, 아토피 군에서 상재균의 다양성이 낮다는 “biodiversity hypothesis”도 제시되고 있다. 또한, 아토피는 출생 후 1개월 이내에 장내 세균총의 다양성이 낮다고 하며[6], 피부 상재균의 종류가 많을수록 아토피가 적다는 연구도 있다[7].

분만법의 차이에 따라 산도 상재균 또는 피부 상재균에 대한

Received 16 July, 2013, Revised 1 November, 2013, Accepted 7 March, 2014

Correspondence: Hae-Ran Lee, Department of Pediatrics, Hallym University College of Medicine, 896 Pyeongchon-dong, Dongan-gu, Anyang 431-070, Korea. (Tel) 82-31-380-4110, (Fax) 82-31-380-4107, (E-mail) drran@hallym.or.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

노출이 달라서, 출생후 자연분만과 제왕절개술을 실시한 군에서 출생 후 초기 장내 세균총의 차이가 발생할 수도 있다. 하지만, 국내 영아에서는 출산 방법과 세균총의 변화를 관찰하는 연구는 거의 없으며, 출산방법과 소아 아토피의 연관성을 조사한 연구에서는 일치된 결과를 보이지는 않았다[8,9].

이 연구에서는 영아에서 출생 후 9개월간 장내 세균총 중 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*를 배양하여, 아토피 군과 비아토피 군에서의 정착률 차이를 알아보고자 하였다. 또한, 전체 영아에서 출산방법에 따라 이들 세균의 정착률 차이가 있는지를 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상

2005년 7월에서 2006년 7월 사이에 서울시내 2개 종합병원에서 출생한 정상 신생아를 대상으로 하였다. 연구 대상 신생아는 모유 수유군 30명, 분유 수유군을 90명을 목표로 최소 4개월간 식이를 유지하기로 하였으며, 중도에 혼합수유를 하거나 3차에 걸친 아토피 검사를 시행하지 않은 경우, 분변 검체 수집이 어려운 경우는 제외하기로 하였다. 또한, 출생시 자연분만 혹은 제왕절개술을 실시했는지 여부를 조사하였다. 신생아의 직계 보호자가 연구에 대한 설명을 듣고 한 후 서면화된 동의서를 작성하였다. 분변 검체는 생후 1일, 3일, 7일에 채취하였고, 1개월, 2개월, 4개월, 6개월, 9개월에 자가에서 수집하였으며 비닐 봉투에 밀봉하여 검사실로 운반하였다. 이 연구는 한림의대 강동성심병원의 임상시험 심사위원회 심의(IRB05-01)를 통과하였다.

2. 알레르기 검사

아토피 가족력 및 알레르기 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염 등의 병력은 생후 1일, 6개월, 12개월에 3차에 걸쳐 조사하였다. 혈청 총 IgE는 생후 4개월, 9개월에 시행하였고 Coat-A-Count Total IgE immunoradiometric assay (DPC, Los Angeles, USA)로 측정하여 13.0 IU/mL 이하를 정상으로 판정했다. 피부 반응검사는 생후 12개월에 집먼지 진드기 2종, *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF)과 주요 식품 항원인 콩, 밀가루, 계란, 땅콩, 우유에 대해 시행하였다. 각 항원에 대한 팽진이 3 mm 이상이면 양성으로 판정하고[10], 한 개 이상의 항원에 양성 반응을 보이는 경우를 아토피라 정의하였다.

3. 검체 처리

분변의 무게를 측정후 1 gram 당 10 mL에 해당하는 생리식염수를 가한 다음, 나무 막대로 균질화 시킨 후 가볍게 혼합하였다. 10% 분변 부유액 1 mL와 생리식염수 9 mL를 혼합하

여 희석하여 첫번째 접종액을 만든 후 100 μ L를 생리식염수 9.9 mL에 혼합하여 계단 희석하였다. 최종적으로 1검체당 4단계의 접종액을 만들어서 100 μ L씩 배지에 접종하였다. 이 연구에서의 세균 검출 한계는 1,000 CFU/gram이었다.

4. 세균 배양과 동정

호기성 및 통성혐기성균 배양은 blood agar plate (BAP), *S. aureus* 검출은 mannitol-salt agar (MSA; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), *E. coli* 검출은 *E. coli*, coliform group chromogenic agar (chromogenic ECC; Oxoid, Hampshire, UK), *Lactobacillus* 검출에는 de Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS; BD), *Bifidobacterium* 검출에는 5% horse blood 첨가 BL agar (BLA; BD)와 5% horse blood BLA 1 L에 BS 용액(sodium propionate 6 g, paromomycin sulfate 20 mg, neomycin 40 mg, lithium chloride 1.2 g, 증류수 20 mL) 20 mL를 혼합한 *Bifidobacterium* selective agar (BSA)를 사용하였다.

BAP는 CO₂ 배양기, MSA, ECC는 일반배양기를 사용하여 37°C, 48시간 배양하였고, MRS, BLA, BSA는 혐기성 상자에서 37°C, 72시간 배양하였다.

전체 균주 수는 BAP와 BL에서 배양된 균집락의 수를 측정하였고, MSA 배지에서 *S. aureus*가 의심되는 경우 그람염색과 coagulase, catalase, DNase, mannitol 검사로 동정하였다. ECC에서 보라색을 보인 균집락이 자란 경우 *E. coli*로 동정하였다. MRS 배지에서 *Lactobacillus* spp.로 의심되는 경우 API 50 CH kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 확인하였다. BL 배지와 BS 배지에서 *Bifidobacterium*로 의심되는 경우 그람염색으로 확인 한 뒤 rapid ID 32A (bioMérieux)를 시행하여 *Bifidobacterium* spp.를 확인하였다.

5. 통계학적 분석

본 연구에서 통계분석은 SPSS for Windows (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 아토피와 비아토피 군에서 배양된 세균의 빈도는 chi-square test와 Fisher's exact test를 사용하여 분석하였으며 출생 후 1일, 3일, 7일, 1개월, 2개월, 4개월, 6개월, 9개월별로 두 군에서의 정착률 차이를 알고자 하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

RESULTS

연구 대상에 포함된 영아는 총 48명이었으며 12개월 후 아토피로 확인된 영아가 12명, 아토피가 없는 영아는 36명이었다. 남녀 비율은 아토피 군에서 1.71:1 (남 7, 여 5), 비아토피군은 1.00:1 이었다(Table 1). 분만형태는 아토피 군이 정상분만 7명 (58.3%), 제왕절개 5명(41.7%)이었으며, 비아토피 군의 정상분

Table 1. Description of children included in the study

Group	Atopy, No. (%) (n=12)	Healthy, No. (%) (n=36)	P value
Boys	7 (58.3)	18 (50.0)	0.6168
Vaginal delivery	7 (58.3)	16 (44.4)	0.4042
Maternal atopy	3 (25.5)	0 (0)	0.0127
Paternal atopy	3 (25.5)	2 (5.6)	0.0918
Breast feeding	2 (16.7)	8 (22.2)	1.0

만은 16명(44.4%), 제왕절개는 20명(55.6%)이었다. 가족력을 확인한 결과 아토피 군에서는 어머니가 아토피인 경우는 3명(25.5%), 아버지가 아토피인 경우는 3명(25.5%)이었으며, 비아토피 군에서는 어머니가 아토피인 경우는 없었으며, 아버지가 아토피인 경우는 2명(5.6%)이었다. 아토피 군 12명 중 비염은 6명(50.0%), 피부반응 양성자는 7명(58.3%)이었으며 비염과 피부반응을 동시에 보인 경우는 1명이었다. 피부반응검사 항원에

대해 1항목만 양성인 환자는 3명(콩 2, 밀가루 1), 2항목에서 양성인 경우 1명(밀가루/콩), 3항목에서 양성인 경우 3명(계란/땅콩/콩, DP/PF/계란, DP/밀가루/콩) 이었다.

9개월간 추적하면서 세균 배양을 위한 분변 검체를 얻을 수 있었던 영아의 수는 생후 1일 검체 19명(비아토피 12명, 아토피 7명), 3일 29명(비아토피 21명, 아토피 8명), 7일 38명(비아토피 28명, 아토피 10명), 1개월 41명(비아토피 29명, 아토피 12명), 2개월 42명(비아토피 31명, 아토피 11명), 4개월 32명(비아토피 22명, 아토피 10명), 6개월 29명(비아토피 22명, 아토피 7명), 9개월 12명(아토피 6명, 비아토피 6명)이었다. 8검체 모두 얻은 경우는 8명, 7검체는 4명, 6검체는 8명, 5검체는 8명, 4검체는 11명, 3검체는 7명, 2검체는 2명이었다.

출생 후 *E. coli*의 정착률은 점점 증가하는 경향을 보여 1개월 이후 58.3-85.7%의 분리율을 보였다(Fig. 1). 아토피 군의 정착률은 1일, 3일, 7일에 14.3%, 12.5%, 20.0%, 비아토피 군은 1일, 3일, 7일에 16.7%, 52.4%, 50.0%를 보였으나 통계적으로

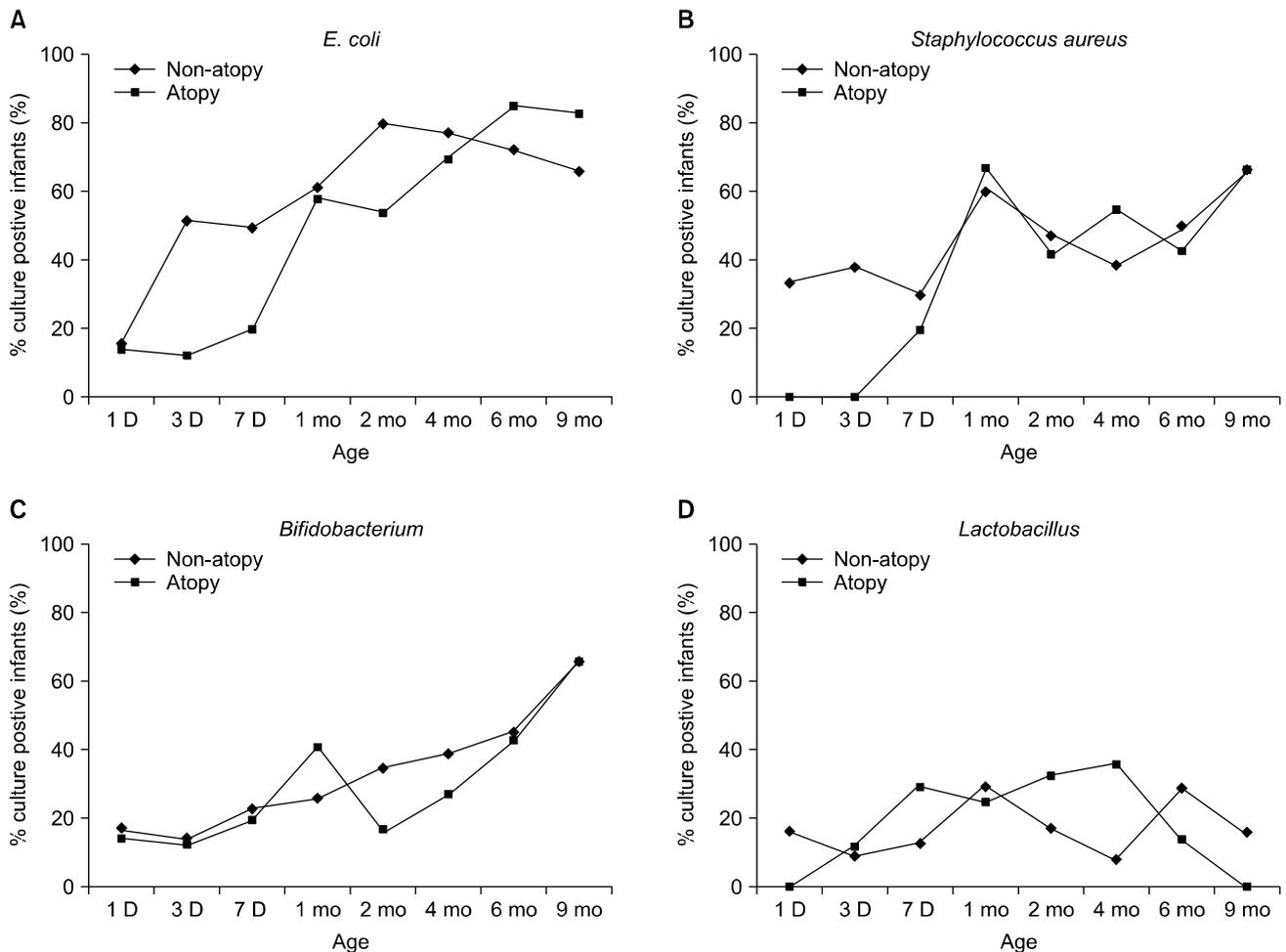


Fig. 1. Intestinal colonization rate in infants with allergic or nonallergic patients. At 3 days of age, the colonization rates of (A) *Escherichia coli* and (B) *Staphylococcus aureus* in nonallergic group (52.4% and 38.1%) was higher than those of allergic group (12.5% and 0%), without statistical significance ($P=0.093$ and $P=0.066$). No significant differences were observed in (C) *Bifidobacterium* and (D) *Lactobacillus* colonization.

Table 2. Intestinal colonization rate in all the infants after birth

Bacteria	Intestinal colonization rates							
	1 D (n=19)	3 D (n=29)	7 D (n=38)	1 Mo (n=41)	2 Mo (n=42)	4 Mo (n=32)	6 Mo (n=29)	9 Mo (n=12)
<i>E. coli</i>	15.8%	41.4%	42.1%	61.0%	73.8%	75.0%	75.9%	75.0%
<i>S. aureus</i>	21.1%	27.6%	28.9%	61.0%	42.9%	46.9%	55.2%	66.7%
<i>Bifidobacterium</i>	15.8%	13.8%	23.7%	29.3%	31.0%	34.4%	48.3%	66.7%
<i>Lactobacillus</i>	10.5%	10.3%	18.4%	29.3%	23.8%	21.9%	27.6%	8.3%

는 유의한 차이가 없었다($P=1.000$, $P=0.093$, $P=0.143$).

*S. aureus*는 아토피군에서 1일, 3일째는 검출되지 않았으나 비아토피군에서는 33.3%, 38.1%가 검출되었다. 하지만, 1일과 3일째 정착률의 통계적 차이는 없었다($P=0.245$, $P=0.066$). 1개월 이후에도 두 군의 정착률의 차이는 없었고, 39.1-66.7% 범위를 보였다(Fig. 1).

*Bifidobacterium*의 출생후 분리율은 출생 1일째 아토피 군 14.3%, 비아토피 군 16.7%로 부터 9개월째 아토피 군 66.7%, 비아토피 군 66.7%를 보여 증가하는 추세였으나, 연구기간 중 아토피군과 비아토피군의 차이는 없었다.

*Lactobacillus*의 분리율은 아토피 군에서 0-40.0%, 비아토피 군에서 9.5-31.8%의 범위를 보였으며, MRS 배지에서 다른 세균과 같이 분리되는 경우가 많아서 다른 균종의 분리율 보다는 낮았다.

아토피군과 비아토피군을 포함한 전체 영아의 출생후 정착률은 다음과 같다(Table 2).

장내에 상재균으로 알려진 *E. coli*와 *Bifidobacterium*은 자연 분만과 제왕절개 분만법의 차이에 따라 다를 것으로 추정되었지만, 이번 연구 결과 큰 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

모유 수유와 분유 수유에 따른 비교는 계획과 달리 대상군에

서 이탈하는 경우가 많았기 때문에 대상군 수가 적었고 따라서 의미있는 결과를 얻기 어려웠다. 간략히 결과를 제시하면, 모유 수유군 10명 중 아토피 발생은 2명(20%)였으며 분유 수유군 38명 중 아토피 발생은 10명(26.3%)이었으며($P=1.000$), 가족력에서 어머니의 아토피 병력이 있는 6명을 제외한 경우, 모유 수유군 7명 중 아토피 발생은 1명(14.3%)이고, 분유 수유군 35명 중 아토피 발생은 8명(18.2%)으로 차이가 없었다($P=1.000$).

DISCUSSION

장내 세균총은 출생 직후에는 산도나 주위환경에 유래한 세균이 자리잡은 뒤에 다양한 균종이 정착되는 것으로 알려져 있다. 장내 세균총은 장내에서 대사 과정에 관여하며 다른 병원균으로부터 장을 보호하고 면역계의 발달과 균형에 영향을 미친다고 알려져 있으므로[11], 장내 세균총과 아토피와의 연관성에 대한 연구가 많이 시행되었다. 출생 초기 *E. coli*나 *S. aureus*, *C. difficile*의 정착과 아토피 발생, *Bifidobacterium*이 정착된 군에서 아토피 예방 효과를 관찰한 연구도 있으며, 균종별로 세분화하여 영아 아토피 군에서 특정 *Bifidobacterium* 균종이 검출되지 않았다는 보고[1,4,11]도 있을 정도로 다양한 연구

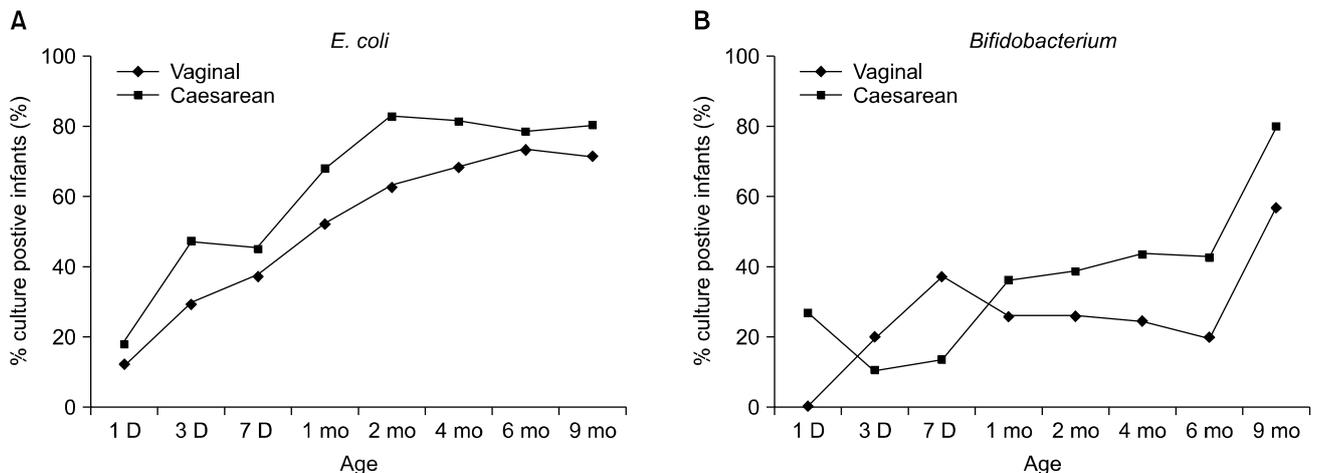


Fig. 2. Intestinal colonization rate of (A) *E. coli* and (B) *Bifidobacterium* in infants vaginally delivered and by caesarean section. Half of the infants had *E. coli* after 1 months of age, while half had *Bifidobacterium* at 9 months of life. There was no difference in colonization rate between these two groups during 9 months.

결과가 제시되고 있다.

장내 세균총은 다양한 세균으로 이루어져 있으나, 이 연구에서는 *E. coli*, *S. aureus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 장내 정착을 알아보고자 하였다. *E. coli*는 주요 장내세균 중의 하나로서, 자연분만 시 산도 주위에서 유래한 세균이 신생아의 장에 정착하는 것으로 알려져 있다. *S. aureus*는 그람양성구균으로서 아토피 발생과 연관되어 있으며 아토피 증세를 악화시키기도 한다[4,12]. *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*는 일반적으로 아토피 군에서 장내 정착이 지연된다고 알려져 있다[13].

이번 연구에서 대상군이 적어서 모유, 분유 수유군에서의 장내 세균 정착은 차이를 관찰하기 어려웠다. 하지만, 기존의 보고에서 모유수유는 아토피피부염과 소아 초기 천명을 예방하며, 아토피를 방어하는 효과가 있을 것으로 보이며, 아토피의 위험요소나 어머니의 천식 병력에 관계없이 영아에서는 4-6개월간 완전 모유 수유를 권장하고 있다[14].

장내 세균총은 모유 수유 등의 식이, 출산법, 환경노출, 유전적 차이, 검사법 등의 차이로 인해 다양한 결과를 보인다. 따라서, 아토피의 원인으로 특정 세균을 지목하기는 어려우며, 일부 균종의 경우 의미 없다는 보고도 있다[3].

이번 연구에서 출생 후 1일, 3일, 7일, 1개월, 2개월, 4개월, 6개월, 9개월 시기에 아토피 군과 비아토피 군의 장내 세균 정착을 분석한 결과, 군 정착은 출생 후 시기에 따라 변화가 있었으나 각 균종의 장내 정착과 아토피 발생의 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 출생 초기에 가장 큰 차이를 보인 것은 *E. coli*와 *S. aureus*였다. 출생 후 3일째 *E. coli*는 아토피 군의 12.5% (8명 중 1명), 비아토피 군의 52.4% (21명 중 11명)에서 분리되었으며, *S. aureus*는 아토피 군의 0% (8명 중 0명), 비아토피 군의 38.1% (21명 중 8명)에서 분리되어 *E. coli*와 *S. aureus*는 비아토피 군에서 정착률이 높았지만 통계적인 유의성은 없었다. 하지만, 각 군의 수가 적은 편이므로 통계적인 의의를 확인하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

전체 영아의 3분의 1은 자연 분만시 산모의 *E. coli*에 의해 장관 집락이 형성되지만, 1970년대에는 선진국에서도 출생 후 수일 이내에 의료인을 통해 *E. coli*가 정착되는 경우가 상당수 있었으며, 70%의 영아에서 생후 1주일 이내에 *E. coli*가 분리되었다고 한다. 그러나, 최근에는 병원과 가정의 위생환경 향상으로 *E. coli*의 장내 정착 시기가 늦어지고 있으며, 1990년대 말 스웨덴 영아에서 *E. coli*는 출생 후 3일째 42%, 2주일째 50%, 2개월째 61%에서 분리되어, 영아에서 *E. coli*가 정착되는 시기가 최근에는 지연되고 있다[15]. 이번 연구에서는 전체 영아의 *E. coli* 정착률은 출생 후 3일째 41.4% (29명 중 12명), 2개월에 73.8% (42명 중 31명)으로 1990년대 말 스웨덴의 보고와 큰 차이가 없었으므로, 우리나라의 출산 환경이 크게 다르지 않을 것으로 추정된다. 하지만, 이때의 스웨덴 보고에서는 출생 3일째 알러지 군과 비알러지 군에서 *E. coli*의 정착률은 동일하게

42%를 보여 두 군간의 차이는 없었다[15].

이번 연구에서 비아토피 군에서 출생 후 1주일 이내에 *E. coli*와 *S. aureus*가 조기 정착하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성이 관찰되지 않았으므로 세균 정착의 지연이 아토피와 연관되어 있다고 말하기는 어렵다. 장관내 세균총은 다양한 세균으로 구성되어 있으므로 이 두 균종의 정착과 아토피 발생을 연관시키기는 어렵지만, 아토피 발생의 소인이 있는 유아에서는 흔히 분리되는 세균의 정착이 늦을 가능성에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. 한편, 신생아에서는 *S. aureus*에 의한 심각한 감염증이나 staphylococcal scalded skin syndrome 등이 발생할 수 있으며[16], *E. coli*에 의한 감염증이 발생할 수도 있으므로[17], 신생아에서 *S. aureus*나 *E. coli*의 빠른 정착이 전반적인 건강에 미치는 영향에 대해서는 단정하기 어려울 것이다.

스웨덴과 에스토니아에서 시행된 연구에서는 비아토피 군과 아토피 군의 *Bifidobacterium* 정착률 차이는 출생 후 1주일째 50%, 17%, 1개월째 69%, 39%, 3개월째 62%, 28%, 6개월째 42%, 28%, 12개월째 69%, 22%를 보여 비아토피 군에서 *Bifidobacterium* 정착률이 의미있게 높았고[12], 출생 후 2년째에도 71%, 59%로 차이를 보였다고 하며[18], 기존의 연구에서는 *Bifidobacterium* 장내 정착이 잘 일어난 군에서 아토피의 위험이 낮은 것으로 알려져 있다. 핀란드 유아를 대상으로 한 연구에서는 *Bifidobacterium*-like bacteria의 3일째 정착률은 62%였고, 2개월 때 정착률은 90%로 증가하였다[19]. 이번 연구에서 *Bifidobacterium* 정착률은 비아토피 군과 아토피 군 사이에 통계적인 유의성은 없었으며, 출생 후 9개월까지 증가하는 양상을 보였는데 *Bifidobacterium*의 정착률은 3일째 13.8% 2개월째 31.3%로 시간이 지날수록 증가하여 9개월째에는 66.7%의 정착률을 보였다. 외국과 우리나라 영아에서 *Bifidobacterium* 정착률 차이는 이 세균에 대한 노출 정도나 식이의 차이가 작용한 것으로 보인다. 이번 연구에서는 비아토피 군에서 3일째 *S. aureus*, *E. coli*의 정착률이 높은 경향을 보였을 때에도 *Bifidobacterium*의 아토피 군과 비아토피 군의 보균율은 12.5%와 14.3%로 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다. 따라서, 우리나라 영아에서는 *Bifidobacterium*의 정착과정과 아토피와의 관련성이 서구와 다를 것으로 추정된다.

이번 연구에서는 검체 채취와 운반과정에서 밀봉한 비닐 봉투를 사용하였는데 혐기성 세균인 *Bifidobacterium*이 이 과정에서 생존률이 저하되었을 가능성이 있으며, 첨가하는 항생제를 기존의 식품공전의 40% 정도로 낮추었음에도 BS 선별배지에서 일부 *Bifidobacterium*이 억제될 수도 있으므로 전반적인 검출률이 낮아졌을 가능성도 있다. 또한, 이번 연구에서는 의심되는 집락을 모두 생화학적으로 *Bifidobacterium*로 동정하였으므로 *Bifidobacterium*-like bacteria를 모두 포함한 다른 연구에 비해 검출률이 낮았을 가능성도 있으므로 단순 비교하기는 어렵다.

*Lactobacillus*의 경우 전체 영아에서 3일째 정착률은 10.3%, 2개월째 정착률은 23.8%를 보였고, 연구 기간 중 40% 이내의 정착률을 보여 정착이 쉽지 않은 것으로 보인다. 핀란드의 한 연구에서는 *Lactobacillus*-like bacteria의 3일째 정착률은 11% 2개월째 47%를 보였는데[19], 이번 연구는 전용 배지에서 백색의 큰 집락을 선택하여 생화학적인 동정과정을 거쳐 *Lactobacillus*가 아닌 균은 배제하였으므로 기존의 연구 결과에 비해 검출률이 낮게 조사되었을 것으로 추정된다. 또한, 이 세균에 대한 노출이나 서양과 우리나라의 식이 차이도 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각한다. 이번 연구에서 *Lactobacillus* 배양에 사용한 배지는 'lactic acid bacteria'의 배양에 많이 사용하고 있는 De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 배지로서, sodium acetate 등의 억제제가 들어 있으나 다른 균종을 억제할 수 있는 범위가 제한적이므로 *Lactobacillus* 외에도 *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 등의 유산균도 자랄 수 있다[20]. 따라서, 선택적으로 *Lactobacillus*를 배양하기가 어려웠다. 실제로 MRS 배지에서 관찰된 다수의 균이 그람양성구균이었으며, *Bifidobacterium*이 자라는 경우도 있었다. 따라서, MRS 배지위에서 여러 종류의 'lactic acid bacteria'가 자란 경우 이 균종을 모두 동정하기 어려우므로 새로운 동정법을 도입하거나 lactic acid bacteria로 통합하여 조사하는 방법도 고려해야 할 것으로 보인다.

이 연구에서는 장내에서 흔히 분리되며, 중요한 것으로 알려진 4가지 균종에 대해서만 살펴보았으므로, 최근의 유전체 분석에 의한 결과와는 다를 것으로 생각한다. 실제로 다양한 배지에서 자란 그람양성구균이나 그람염색상 또는 생화학적으로 다른 균종의 경우 상당수는 *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Eubacterium* 같은 유산균으로 추정된다. 또한, *E. coli* 이외의 장내세균과 *Bacteroides*, *Clostridium* 등도 이번 연구에서는 조사하지 못하였다. 장내세균총은 식이와 시기에 따라 상당한 변화를 보일 수 있고 균수가 검출 한계 이하로 존재할 수 있으므로, 이번 연구와 같이 세균 배양을 통한 연구에서는 실제 장내 세균총을 반영한다고 볼 수는 없다. 하지만, 이번 연구는 기존에 쉽게 정착되거나 아토피와의 연관성이 알려진 세균을 대상으로 아토피 발생을 추적관찰한 연구로서 배양 검사를 위주로 한 다른 연구와 비교 자료로서 의의를 가진다고 생각한다.

자연 분만과 제왕절개 같은 분만법 차이에 따라 신생아의 세균의 장내 정착 양상이 달라질 수 있다[1]. 핀란드의 한 연구 [21]에서는 *Bifidobacterium*-like bacteria의 정착률이 자연 분만 한 경우 생후 3일째 82.3%, 10일째 96.8%, 1개월째 90.9%를 보였으나, 제왕 절개의 경우 생후 3일째 36.7%, 10일째 53.6%, 1개월째 82.8%를 보여 자연분만으로 태어난 신생아의 경우 대다수가 초기 10일 이내에 *Bifidobacterium*-like bacteria가 정착하는 결과를 보였다. 분만법에 따라 장내세균총의 차이가 생기고 아토피 위험이 다르다는 연구가 많았지만, 이번 연구에서

자연분만과 제왕절개 군에서 4가지 균종의 큰 차이는 보이지 않았다. 우리나라에서 시행된 연구에서는 아토피와 분만법의 연관성에 대해서는 이견이 있다[8,9,22].

염기서열분석 검사법의 발달로 전체 장내세균의 세균의 유전자를 분석하여 세균총의 분포를 조사하는 방법이 최근 많이 시도되고 있다[23]. 전체 균종을 분석하기에는 한계가 있는 세균 배양법에 비해 전체유전자염기서열 분석법은 장내 세균총 분포의 이해에 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

이번 연구에서는 우리나라 신생아 분만에서 출생후 9개월간 *E. coli*, *S. aureus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 등의 장내 정착률에 대한 기초 자료를 수집하고, 이 세균들의 정착과 아토피 발생과의 연관성을 알아보려고 하였다. 출생 후 초기 1주일 이내에 아토피 군과 비아토피 군에서 *E. coli*, *S. aureus* 정착률 차이가 있음을 시사하였지만 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 장내 세균총은 다양한 세균으로 이루어져 있으며, 면역계 발달에 영향을 미칠 수 있으므로 출생 초기의 다양한 장내세균의 변화와 아토피의 연관성에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

ACKNOWLEDGMENTS

이 연구는 (주)매일유업의 연구비(IRB05-01) 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

1. Johnson CL and Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012;129:950-60.
2. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
3. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007;62:1223-36.
4. Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2006;144:1-9.
5. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:646-52.e1-5.
6. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:434-40, 440.e1-2.
7. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:8334-9.
8. Park YH, Kim KW, Choi BS, Jee HM, Sohn MH, Kim KE. Relationship between mode of delivery in childbirth and prevalence of allergic diseases in Korean children. *Allergy Asthma*

- Immunol Res 2010;2:28-33.
9. Lee YJ, Jee HM, Kim BJ, Kim HB, Yu J, Lee SY, et al. Prevalence of allergic diseases in children according to mode of delivery. *Pediatr Allergy Respir Dis* 2011;21:197-206.
 10. Pyun BK, Kim WK, et al. eds. *Pediatric Allergy Immunology Pulmonology*. 2nd ed. The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease; 2013:69-72.
 11. Guarner F. Hygiene, microbial diversity and immune regulation. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:667-72.
 12. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:516-20.
 13. Kalliomäki M and Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:15-20.
 14. Lee HB. Effects of breastfeeding on the development of allergies. *Hanyang Med Rev* 2010;30:49-59.
 15. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 2003;54:8-14.
 16. Yi J and Kim EC. Microbiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J Clin Microbiol* 2010; 13:1-6.
 17. Oh HR, Moon DS, Jang SJ, Li XM, Kim DM, Park SG, et al. Epidemiological investigation of an outbreak of *Escherichia coli* infections in neonatal intensive care unit of a university hospital. *Korean J Clin Microbiol* 2008;11:123-8.
 18. Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29:342-6.
 19. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83:F186-92.
 20. Hartemink R and Rombouts FM. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J Microbiol Methods* 1999;36:181-92.
 21. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:19-25.
 22. Kim BS. Is mode of delivery associated with an increased risk for childhood asthma? *Pediatr Allergy Respir Dis* 2011;21:250-60.
 23. Tilg H and Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011;121:2126-32.

=국문초록=

출생 후 9개월간 영아의 장내 세균 변화와 아토피

한림대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ²소아과학교실

김재석¹, 성태정², 박흥규², 박지영¹, 조현찬¹, 황일태², 이해린²

배경: 장내 세균총은 연령, 식이, 환경에 따라 다양한 변화를 보인다. 신생아의 출생 후 장내 세균의 변화와 아토피 발생의 연관성에 대해 여러 논란이 있다. 이 연구는 출생 후 9개월 간 장내 세균의 변화와 아토피 발생의 연관성에 대해 알아보고자 하였다.

방법: 정상 신생아의 분변을 출생후 1일, 3일, 7일, 1개월, 2개월, 4개월, 6개월, 9개월에 수집하여 *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*를 선택배지를 사용하여 배양하였다. 영아의 아토피 여부를 알기 위해 임상 소견과 함께 혈청 총 IgE, 피부반응검사를 시행하였다.

결과: 12개월 후 48명의 영아에서 비아토피 군은 36명(75.0%), 아토피 군은 12명(25.0%)이었다. 비아토피 군과 아토피 군이 가장 큰 차이를 보인 것은 3일째로 *E. coli* 정착률 52.4%, 12.5%와 *S. aureus* 정착률 38.1%, 0%였으나 통계적인 차이는 없었다($P=0.093$, $P=0.066$). *E. coli* 정착률이 50%에 도달한 시기는 정상군에서는 3일 이후였으나 아토피 군은 1개월 이후였다.

결론: 영아의 아토피 군과 비아토피 군에서 장내 세균 정착률의 통계적인 차이는 관찰되지 않았다. 그러나, 비아토피 군에서는 출생 초기인 1주일 이내에 *E. coli*와 *S. aureus*의 정착이 빠르게 일어났다. 아토피와 출생 초기의 장내세균의 정착 및 다양성과의 연관성에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다. [*Ann Clin Microbiol* 2014;17:73-79]

교신저자 : 이해린, 431-070, 경기도 안양시 동안구 평촌동 896
 한림대학교 의과대학 소아과학교실
 Tel: 031-380-4110, Fax: 031-380-4107
 E-mail: drran@hallym.or.kr