한방비만학회지 제19권 제2호, 2019
J Korean Med Obes Res 2019;19(2):97-105
https://doi.org/10.15429/jkomor.2019.19.2.97

pISSN 1976-9334, eISSN 2288-1522

JKOMOR

Original Article

기관절개술을 시행한 뇌졸중 환자들에서의 기도미생물 탐색 연구

성은학 · 최유라 · 임수경 · 이명종 · 남영도[1] · 송은지[1] · 김호준

동국대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, [1]한국식품연구원 장내미생물연구단

Airway Microbiota in Stroke Patients with Tracheostomy: A Pilot Study

Eunhak Seong, Yura Choi, Sookyoung Lim, Myeongjong Lee, Youngdo Nam[1], Eunji Song[1], Hojun Kim

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, [1]Research Group of Gut Microbiome, Korea Food Research Institute

Received: October 31, 2019
Revised: November 23, 2019
Accepted: December 2, 2019

Correspondence to: Hojun Kim
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital, 27, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang 10326, Korea
Tel: +82-31-961-9111
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: kimklar@dongguk.ac.kr

Copyright © 2019 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: We investigated differences between the tracheostomized and the non-tracheostomized stroke patients through microbiological analysis for the purpose of preliminary explorations of full-scale clinical research in the future.
Methods: We collected tracheal aspirates samples from 5 stroke patients with tracheostomy and expectorated sputum samples from 5 stroke patients without tracheostomy. Genomic DNA from sputum samples was isolated using QIAamp DNA mini kit. The sequences were processed using Quantitative Insights into Microbial Ecology 1.9.0. Alpha-diversity was calculated using the Chao1 estimator. Beta-diversity was analyzed by UniFrac-based principal coordinates analysis (PCoA). To confirm taxa with different abundance among the groups, linear discriminant analysis effect size analysis was performed.
Results: Although alpha-diversity value of the tracheostomized group was higher than that of the non-tracheostomized group, there was no statistically significant difference. In PCoA, clear separation was seen between clusters of the tracheostomized group and that of the non-tracheostomized group. In both groups, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* were identified as dominant in phylum level. In particular, relative richness of *Proteobacteria* was found to be 31% more in the tracheotomized group (36.6%) than the non-tracheostomized group (5.6%)($P<0.05$). In genus level, *Neisseria* (24%), *Prevotella* (17%), *Streptococcus* (13%), *Fusobacteria* (11%), *Porphyromonas* (7%) were identified as dominant in the tracheostomized group. In the non-tracheostomized group, *Prevotella* (38%), *Veillonella* (20%), *Neisseria* (9%) were genera that found to be dominant.
Conclusions: It is meaningful in that the tracheostomized group has been identified a higher rate of microbiotas known as pathogenic in respiratory diseases compared to the non-tracheostomized group, confirming the possibility that the risk of opportunity infection may be higher.

Key Words: Stroke, Tracheostomy, Microbiota

서론

건강상태의 폐는 멸균상태인 것으로 추정되어 2007년 경부터 시작된 The Human Microbiome Project에서 생략되었다[1]. 하지만 배양 비의존성 검사법이 발전하면서 건강상태의 사람의 폐에도 상재 미생물이 존재하는 것이 확인됨에 따라[2], 폐에서 유래한 기도미생물의 구성 및 질환과의 상관관계에 대한 관심이 높아지고 있다. 기도미생물은 기도의 점막 세포들과 상호작용하면서 면역항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는데 최근에는 천식, 만성폐쇄성폐질환, 낭포성섬유종 등 개별 질환에 따른 미생물 분포에 대한 연구가 발표되고 있다[1].

기도는 성대를 기준으로 상기도와 하기도로 나뉜다. 상기도는 콧구멍, 비강, 코곁굴, 코인두와 입인두, 성대 윗부분의 후두를 포함하고 하기도는 성대 아래의 후두, 기관, 기관지 및 세기관지, 폐포로 구성되어 있다. 상기도는 pH, 습도, 온도 등의 환경에서 하기도와 차이를 보여 상재하는 균 또한 그 구성이 하기도와 다르다고 알려져 있다[3].

한편, 연하곤란이 있는 뇌졸중 환자의 경우 흡인성 폐렴의 위험이 높아져 경우에 따라 기관절개술을 시행하게 된다[4]. 기관절개술을 시행하면 구강 및 비공을 통한 호흡으로 기류가 상기도를 거치는 비기관절개 환자와 달리 기류가 삽관 부위로 직접 들어오게 되므로[5] 기도미생물에 차이가 있을 것으로 생각된다.

기관절개 환자의 기도미생물에 대한 연구는 시행된 바 있으나 이는 주로 소아를 대상으로 하였으며[6,7], 성인 뇌손상 환자를 대상으로 16S rRNA 분석을 진행한 연구는 아직 확인된 바가 없다. 따라서 본 연구는 성인 기관절개술 시행 환자의 미생물 분석을 통해 기관절개군과 비기관절개군과의 차이를 확인하고 향후 본격적인 임상연구의 예비적 탐색을 목적으로 시행되었다.

대상 및 방법

1. 연구대상자

본 연구는 2019년 2월부터 2019년 5월까지 동국대학교 일산한방병원 한방재활의학과, 한방내과에 입원하여 치료받은 뇌졸중 환자 중 기관절개군 5명, 비기관절개군 5명을 대상으로 한 단일 기관, 단면, 탐색적 연구이다.

동국대학교 일산한방병원 Institutional Review Board의 승인을 받아(승인번호: DUIOH 2019-01-001-001) 진행하였으며, 연구진의 충분한 설명 후 서면 동의서를 작성한 환자를 대상으로 하였다.

1) 선정기준

기관절개군은 만 19세 이상 70세 미만의 뇌졸중 환자를 대상으로 기도절개한 지 최소 1년 이상 경과한 자, 비기관절개군은 뇌졸중 환자 중 특별한 호흡기 질환이 없는 자로 비흡연자를 선정기준으로 하였다.

2) 제외기준

기관절개군 및 비기관절개군 모두 동일한 기준으로 2달 내 항생제를 복용한 자, 최근 1개월 내 생균제를 복용한 자, 악성 종양 또는 만성폐쇄성폐질환이 있는 자, 최근 1주 내 38도 이상의 발열이 있었던 자, 기타 객담 미생물에 영향을 미칠 수 있는 약물(거담제)을 최근 1개월 내 개시하거나 조정한 자, 임상시험 담당자의 소견으로 볼 때 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되는 자 등 상기 제외 기준에 1개 항목 이상 해당되는 경우 본 실험 참여에서 제외하였다.

2. 객담 채취

호흡기 질환 환자에게서 미생물 동정을 위한 객담은 bronchoalveolar lavage fluid (BAL), spontaneous sputum (expectorated sputum), induced sputum, tracheal aspirates 등의 방법으로 얻는다. 이 중 BAL의 경우 민감도, 특이도, 정확도가 높으며, 비교적 안전한 검사법이지만 저산소증, 기관지경련 등 합병증의 위험이 있기 때문에[8,9] 담당의사의 판단에 따라 시행하게 된다. 본 연구는 객담 채취 시 호흡기 내과적 진료를 통해 BAL 시행 적응증이[10] 아닌 환자들을 대상으로 하였기 때문에 tracheal aspirates와 expectorated sputum을 통해 객담을 채취하였다.

기관절개군은 병동 내에 비치되어 있는 흡입기와 멸균된 석션팁(세운메디칼, 천안, 한국), Lukens trap (동화판다, 인천, 한국)을 통해 tracheal aspirates를 확보하였으며, 비기관절개군의 경우 9% 생리식염수(대한약물공업, 서울, 한국)로 1회 입을 헹구고 콧물을 풀어낸 후 숨을 깊게 3번 들이마신 다음 최대 흡기 후 객담을 채즙기(SPL Life Sciences, 포천, 한국)에 뱉었다. 모아진 샘플은 -80°C에 바로 보관하였다.

3. 객담 미생물 DNA 추출

DNA는 DNA Miniprep kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 사용하여 제작사 지시에 따라 DNA를 분리하였다. 25 μL 샘플을 180 μL ATL buffer와 20 μL proteinase K를 넣고 잘 섞어준 후 56°C에서 10분간 세포를 용해시킨 다음 200 μL Buffer AL를 넣고 잘 섞어준 뒤 70°C에서 10분간 반응시켰다. 배양한 샘플에 200 μL 에탄올을 넣고 잘 섞어준 다음 QIAamp spin column에 옮기고 6,000 g에서 1분간 원심분리한 후 500 μL AW1과 AW2로 헹구고 elution buffer로 녹여 DNA를 얻었다. DNA의 순도는 spectrophotometer를 이용하여 A260/A280에서 측정하고 agarose gel에서 DNA

밴드를 확인하였다. 순수 배양된 균주의 genomic DNA와 16S-universal primers를 이용하여 polymerase chain reaction을 수행하였다.

4. 미생물 분석

군집분석 단계는 분석하고자 하는 서열들을 대상으로 미생물 유전체 표준염기서열을 기반으로 분류한 후, 분류되지 않은 서열들을 서열 간의 유사도에 근거하여 분류하는 방법으로 구성되었다. 미생물종 분류는 마이크로바이옴 통합분석도구인 Quantitative insights into microbial ecology (QIIME) 1.9.0을 통해 분석을 시행하였다. Alpha-diversity는 OTUs와 Chao1으로 분석하여 나타냈고, beta-diversity의 경우 UniFrac-based principal coordinates analysis (PCoA) 분석을 통해 확인하였다. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) 분석은 온라인 프로그램 (http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy)을 통해 시행하였다. Linear discriminant analysis (LDA) score는 차별적 특징이 2.0 초과되는 결과와 factorial KruskalWallis test의 alpha value가 0.05 미만인 결과만 나타냈다.

5. 통계 처리

실험값들은 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타냈으며, 특성 비교에서 기관절개군과 비기관절개군 간 student's t-test를 통해 실험군 간의 통계분석을 시행하였다. 통계적 유의성은 P값이 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 보았다.

결과

1. 인구학적 특성

10명의 대상자들은 모두 뇌졸중 환자들로 재활치료를 위해 입원 중이었다. 기관절개군과 비기관절개군의 연령은 각각 평균 49.8세(±8.32), 54.2세(±5.32)로 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

기관절개군의 경우 tracheostomy tube를 통해 프렌치카테터를 이용하여 객담을 일중 간헐적으로 제거 중인 상태였다. 기관절개군 5명 중 4명이 폐렴에 이환되었던 과거력이 있었고, 5명 모두 진해거담제(mucolytic agent)를 경구투약 혹은 분무 흡입 중이었다. 특히 환자 1명(T4)은 만성호흡부전으로 야간(오후 9시~오전 6시)에는 인공호흡기를 하고 있었다.

비기관절개군의 경우 모두 인지장애가 경미하거나 없는 환자들로 5명 중 2명이 폐렴에 이환되었던 과거력이 있었다. 비기관절개군 중 환자 1명(C5)은 성대 마비로 식사 시 영양보급관을 이용하여 음용식을 투여 중인 상태로 객담 채취 당시 흉부엑스레이에서 폐렴 소견이나 발열이 보이지 않았으나 객담 채취 후 객담 성상 악화 등 폐렴소견을

Table 1. Demographic Characteristics

	Tracheostomized	Control
Age	49.8 (±8.32)	54.2 (±5.32)
Gender		
Male	2 (40)	3 (60)
Female	3 (60)	2 (40)
Impression		
Quadriplegia	4 (80)	1 (20)
Hemiplegia	1 (20)	4 (80)
X-ray finding		
Atelectasis	2 (40)	-
Pneumonia	1 (20)	1 (20)
Tuberculosis	1 (20)	1 (20)
Bronchiolitis	-	1 (20)
Non-specific	1 (20)	3 (60)
Smoking history		
Non-smoker	5 (100)	4 (80)
Ex-smoker	-	1 (20)
Past history		
Pneumonia	4 (80)	2 (40)
Influenza A	1 (20)	-
Tracheobronchitis	1 (20)	-
Chronic respiratory failure	1 (20)	-
Tuberculosis	1 (20)	1 (20)
Atelectasis	2 (40)	-
Bronchiolitis	1 (20)	-
Current medication		
Mucolytic agents	5 (100)	1 (20)
Acidifying agents	1 (20)	-
Antihistamines	-	1 (20)
Antitussives	1 (20)	1 (20)
Respiratory smooth muscle relaxants	1 (20)	1 (20)
Beta-agonists	1 (20)	-
Leukotriene receptor antagonist	1 (20)	-
Other features		
Mechanical ventilator applied	1 (20)	-
Feeding catheter usage	5 (100)	1 (20)

Data were expressed as mean (±standard deviation) or number of patients (percentage of corresponding patients).
-: no data.

보여 항생제를 투약하였다(Table 1).

2. 기관절개군과 비기관절개군의 미생물 분석

1) Alpha-diversity

기관절개군과 비기관절개군 각각의 군내 미생물의 종 풍부도를 분석하기 위해 시행한 alpha-diversity 분석(Chao1)에서 기관절개군의 값이 비기관절개군에 비해 높았으나 통계적으로 유의미한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 1).

2) Beta-diversity

각각의 객담 표본 내에 존재하는 미생물 군 사이의 유사도를 비교 분석하기 위해 beta-diversity 분석 중 principle coordinates analysis를 시행하였다. 객담 내 군집 분석을 시행한 결과 기관절개군과 비기관절개군 간에 군집이 명확히 분리되는 양상이 보였으나, C5의 경우 기관절개군 집과 가까운 모습이 관찰되었다(Fig. 2).

3) 객담 내 미생물 분석

기관절개군과 비기관절개군의 객담에서 우점하는 것으로 확인된 문(Phylum)은 *Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Actinobacteria* 5종이었다. 기관절개군에서는 *Bacteroidetes* (36.8%), *Proteobacteria* (36.6%), *Fusobacteria* (14.4%), *Firmicutes* (6.6%), *Actinobacteria* (2.7%), 기타(2%) 순으로, 비기관절개군에서는 *Bacteroidetes* (46.9%), *Firmicutes* (34.4%), *Fusobacteria* (10.6%), *Proteobacteria* (5.6%), *Actinobacteria* (1.7%), 기타(0.5%) 순으로 나타났다. 비기관절개군과 비교하여 기관절개군에 상대적으로 많이 분포한 균은 *Proteobacteria*문이었는데, 31% 차이로 기관절개군에서 유의미하게 더 많았다($P<0.05$). *Firmicutes*문의 경우 27.8% 차이로 비기관절개군에서 더 많은 것으로 확인되었으나, 통계적 유의성은 보이지 않았다($P=0.19$)(Fig. 3).

속 수준에서, 기관절개군에는 *Neisseria* (24%), *Prevotella* (17%), *Streptococcus* (13%), *Fusobacteria* (11%), *Porphyromonas* (7%)이 우세하는 균으로 확인되었고, 비기관절개군에서는 *Prevotella* (38%), *Veillonella* (20%), *Neisseria* (9%)가 우세하는 균으로 확인되었다(상대풍부도 0.05 이상)(Figs. 3, 4).

각 군내의 상대풍부도에서 차이를 보였던 균주는 다음과 같다. 기관지절개군에서는 비 기관지절개군에 비해 *Neisseria* (14%차)(Fig. 4a), *Fusobacteria* (7%차)(Fig. 4b), *Porphyromonas* (3%차)(Fig. 4c), *Streptococcus* (8%차)(Fig.

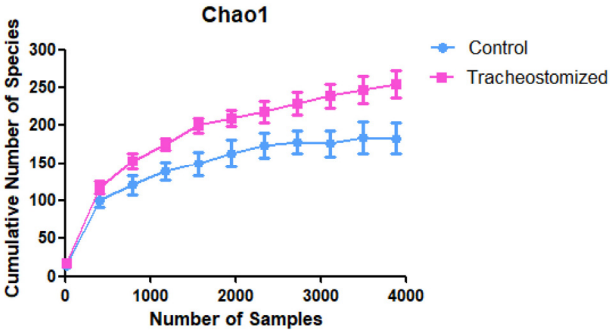

Fig. 1. Alpha-diversity (Chao1). Alpha-diversity was calculated using the Chao1 estimator. The purple and blue lines represent the tracheostomized group and the non-tracheostomized group, respectively.

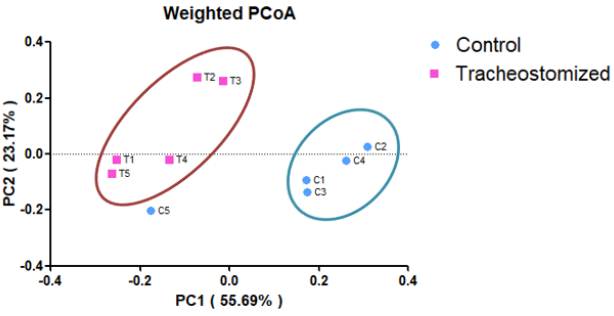

Fig. 2. Weighted PCoA. The total structural differences in microbial community of the samples were analyzed by PCoA. Weighted PCoA accounts for the relative abundance of each taxa within the communities. PCoA: UniFrac-based principal coordinates analysis. PC1: PCoA 1, PC2: PCoA 2, T1~5: Tracheostomized group, C1~5: Non-tracheostomized group.

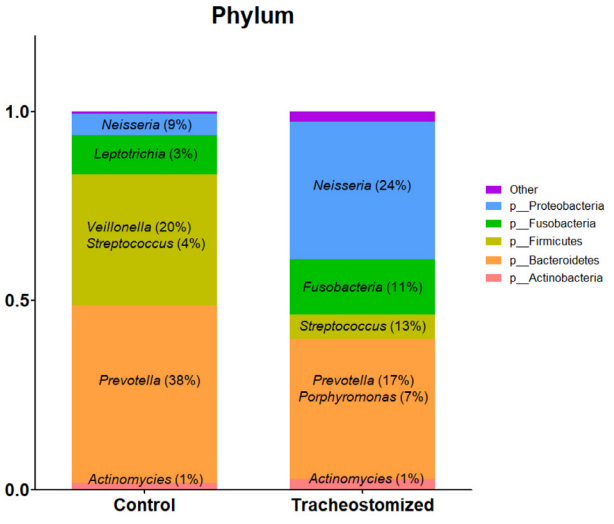

Fig. 3. Average phylum distribution of airway microbiota of the tracheomized and the non-tracheomized patients. Each color indicates a difference in relative abundance at the phylum level and the major strains at the genus level are marked in boxes at the phylum level to which they belong.

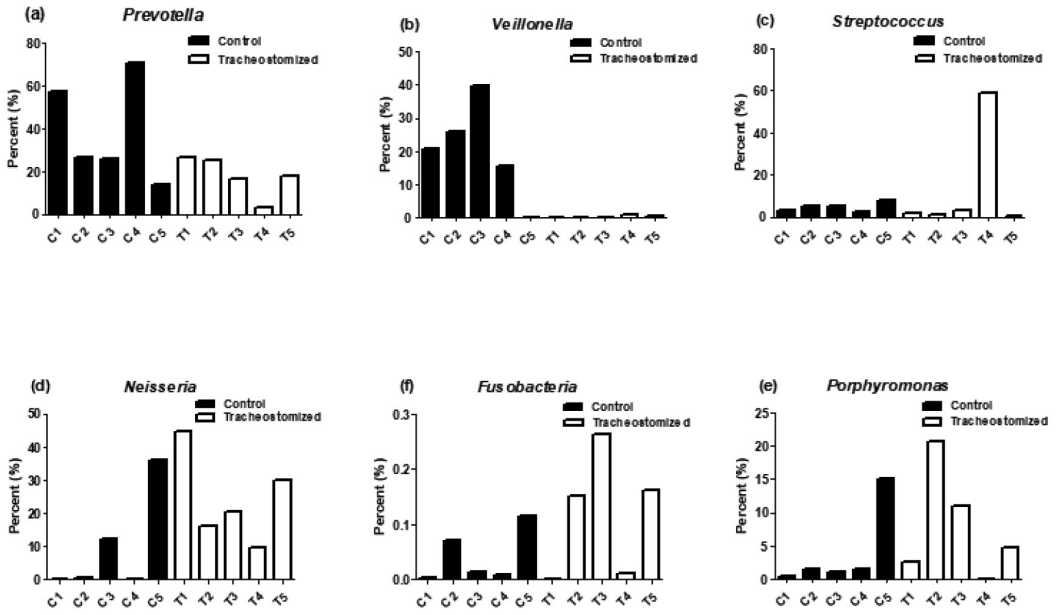

Fig. 4. The relative abundance of specific genus in the tracheomized and the non-tracheomized patients. Genera that showed major differences between the tracheostomized group and the non-tracheostomized group. The vertical bar represents the relative abundance in each sample. T1~5: Tracheostomized group, C1~5: Non-tracheostomized group.

4d)속이 더 많았으며, 비기관지절개군에서는 기관절개군에 비해 *Veillonella* (20%차)(Fig. 4e), *Prevotella* (21%차)(Fig. 4f) 속이 더 많았다. 이들 중 *Veillonella*는 기관절개군에서 비기관절개군에 비해 유의미하게 많은 분포를 보이는 것으로 확인되었다(P<0.05).

4) LDA score analysis

기관절개군과 비기관절개군에서 분포의 차이를 보이는 균주를 확인하기 위해 LefSe 분석을 시행하였다. 앞서 언급한 바와 같이 기관절개군에서는 *Neisseria, Porphyromonas, Prevotella* 등의 균주가, 비기관절개군에서는 *Prevotella, Veillonella* 등의 균주가 우세한 것으로 확인되었다. *Streptococcus*의 경우 평균 상대분포도에서는 기관절개군이 높았으나, LDA score에서는 비기관절개군이 우세한 것으로 확인되었다(Fig. 5).

5) Dendrogram

각 표본들 사이의 유전적 유사도를 확인하기 위해 유전적 거리를 계산하여 dendrogram으로 나타냈다. 개별 표본들은 세 개의 군집을 형성하였는데, T4를 제외한 기관절개군 및 비기관절개군 중 C5, C5를 제외한 비기관절개군, 기관절개군 중 T4로 나뉘었다(Fig. 6). T4의 경우 야간에

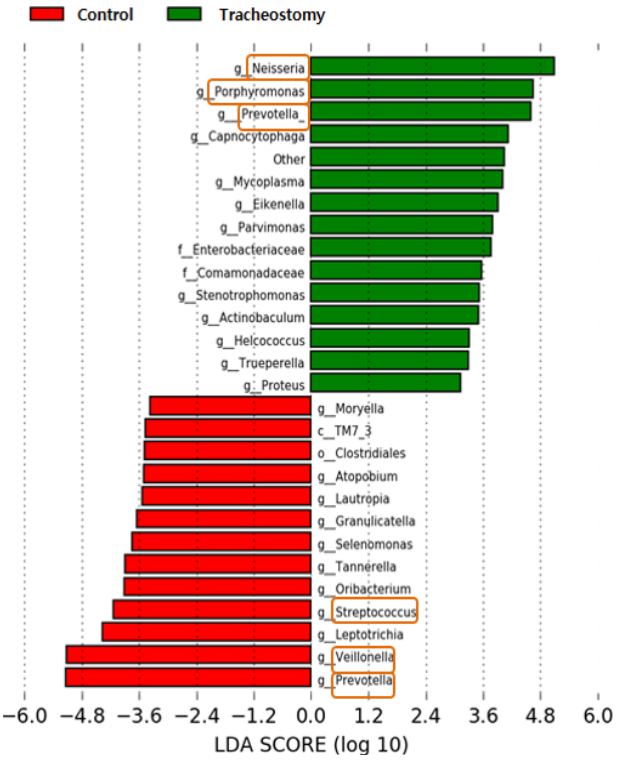

Fig. 5. LDA score. Histogram of the LDA scores for differentially abundant clades in sputum samples between the tracheostomized group and the non-tracheostomized group. Negative (red bars) LDA scores and positive (green bars) LDA scores stand for bacterial groups in the tracheostomized group and the non-tracheostomized group, respectively. LDA: linear discriminant analysis.

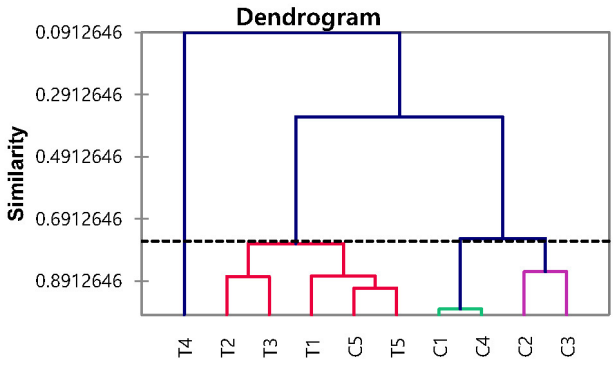

Fig. 6. Dendrogram. Dendrogram represents for hierarchical clustering. The connecting lines were drawn according to their respective similarities. The dotted line means a similarity of 0.76. T1~5: Tracheostomized group, C1~5: Non-tracheostomized group.

인공호흡기를 적용 중인 상태로 기관절개군과 비기관절개군 어느 군집에도 속하지 않고 유사도 또한 낮은 것으로 확인되었다. C5의 경우 객담 채취 후 폐렴으로 진단받아 항생제를 투약하였던 환자로, 비기관절개군보다 기관절개군과 유사도가 높았다.

고찰

호흡기계는 콧구멍에서 폐포까지 이르며, 산소와 이산화탄소를 교환하는 조직기관이다. 호흡기도에는 다양한 미생물이 존재하며, 이러한 미생물들은 호흡기계의 생리적 발달과 면역 항상성의 발달과 유지에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되었다[3]. Next-generation sequencing은 세균배양 비의존성 검사법으로 16S rRNAsequencing에 의해 기존에 동정되지 않았던 균주가 발견되면서 개별적인 만성호흡기질환과 기도미생물과의 상관관계가 밝혀지고 있다[11].

상기도의 상재균들은 병원성 균주의 군체 형성을 막는 역할을 함으로써 하기도의 감염 위험성을 낮추는 역할을 한다[12]. 따라서 상기도의 면역 보호장벽을 거치지 않은 채 하기도를 통해 직접 호흡하는 기도절개술을 시행한 환자들의 미생물 구성이 비절개군과 다를 것이라는 가정 하에 본 연구를 시행하였다.

이번 연구에서 기관절개군 중 기관절개술 후 폐렴 과거력이 있었던 환자는 80% (4/5)로 비기관절개술 환자군 40% (2/5)에 비해 많은 것으로 확인되었다(Table 1). 기관절개술 후에 일어나는 흡인이 발열, 무기폐, 기관지 폐렴 등 호흡기 질환의 주요 원인이 되나, 폐질환의 진행 원인이 기관절개술로 인한 흡인인지 또는 기관절개술 이전의 기저질환 중의 하나인지에 대해 결론을 내릴 수 없다는 후향적 연구도 존재한다[13]. 하지만 최근 시행된 연구들은 기관절개술이 폐렴, 흡인 등의 합병증 위험성을 높일 수 있음을 보이고 있어 기관절개군에서 호흡기 질환에 이환된 병력이 많았던 것으로 나타난 이번 연구의 결과와 일치한다(Table 1)[14].

기관절개군과 비기관절개군의 군집 내 미생물 다양성을 분석하기 위해 시행한 alpha-diversity 분석에서 비록 통계적 유의성은 보이지 않았으나 기관절개군이 더 높은 종 풍부도를 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 장내 미생물의 경우 건강한 사람에게서 미생물 다양성이 높은 경향을 보이는 반면[15], 호흡기 미생물은 각 질환마다 다른 미생물 다양성을 보인다. 이전에 시행된 연구에서 천식, 낭포성섬유종 환자의 경우 건강인 대조군에 비교하여 기도미생물 다양성이 증가되어 있는 경향을 보였으며[16,17], 만성폐쇄성기관지염 환자의 경우 건강인 대조군에 비교하여 기도미생물 다양성이 감소되어 있는 것이 확인되었다. 이번 연구는 질환 특이적으로 군을 나누어 시행하지 않았으며, 호흡기 질환에 따라 미생물 다양성이 다르게 나타난다는 점 등을 참고하였을 때 기도절개술 시행에 따른 미생물 다양성에 대해 의미를 부여하기는 어려울 것으로 생각된다[18].

객담 표본에 존재하는 미생물 군집들 사이의 유사도를 확인하기 위해 시행한 PCoA에서는 기관절개군과 비기관절개군이 명확히 나누어지는 가운데, 비기관절개군에 속하는 C5가 기관절개군들과 가깝게 위치하는 것으로 확인되었다(Fig. 2). C5는 객담 채취 후 폐렴으로 진단받았으며, 다른 비기관절개군의 표본들과 비교하여 호흡기계에서 병원성 균으로 알려진 *Proteobacteria*문과 *Fusobacteria*문, *Porphyromonas*속이 두드러지게 많았던 것으로 확인되었다. 따라서 객담에서 병원성 균주의 비율이 높았기 때문에 기관절개군과의 유사도가 높았을 것으로 생각된다.

각 표본의 미생물 간 유전적 유사도를 확인하기 위해 유전적 거리를 계산하여 나타낸 dendrogram에서는(Fig. 6) 기관절개군 중 T4가 다른 표본들과 약 0.09의 유사도를 보이는 것으로 확인되었다. 이는 T4를 제외한 다른 표본들이 모두 약 0.75 이상의 유사도를 보이는 것과 비교한다면 매우 낮은 수치이다. T4는 만성호흡부전으로 오후 9시

부터 오전 6시까지 인공호흡기를 적용 중인 환자로 2019년 1월 17일에 시행한 흉부엑스레이 상 'improved pneumonia in LLL and RLL zone' 소견이 있었다. T4의 객담 표본에서 *Streptococcus*속이 59%를 점유하고 있는 것으로 확인되었다. 기관절개를 통해 인공호흡기를 적용하는 것은 폐렴의 중요한 위험인자가 된다고 알려져 있으며[19], *Streptococcus pneumonia*를 포함한 *Streptococcus*종은 인공호흡기 관련 폐렴의 원인균 중 12.1% 가량을 차지한다[20]. 이러한 사실로 미루어 볼 때, T4는 영상의학적 소견에서 이전 영상과 비교하여 폐렴이 호전 중이라는 소견이 있었으나, 폐렴 원인균인 *Streptococcus*의 우세로 인해 다른 표본들과 그 유사도가 낮았을 것으로 생각된다.

18세 이하의 소아에서 청년까지 기관삽관술을 시행한 환자 40명을 대상으로 한 이전 연구에서 문 수준에서 *Proteobacteria* (48.8%), *Firmicutes* (26.5%), *Bacteroidetes* (12.5%), *Actinobacteria* (8.3%), *Fusobacteria* (3.2%)로 확인된 바 있으며[7], 이는 성인을 대상으로 한 본 연구의 결과 *Bacteroidetes* (36.8%), *Proteobacteria* (36.6%), *Fusobacteria* (14.4%), *Firmicutes* (6.6%), *Actinobacteria* (2.7%)와 우점종의 종류는 같으나 상대풍부도에서 차이를 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 또한, 소아를 대상으로 한 이전 연구에서 속 수준에서는 *Streptococcus* (16.5%), *Neisseria* (11.0%), *Haemophilus* (8.7%), *Moraxella* (8.1%), *Pseudomonas* (7.8%), *Corynebacterium* (6.6%)이 우점하는 반면[7], 본 연구에서는 *Neisseria* (24%), *Prevotella* (17%), *Streptococcus* (13%), *Fusobacteria* (11%), *Porphyromonas* (7%)이 우점하는 것과 차이를 보였다(Figs. 3, 4). 이는 연령 및 환경에 따라 호흡기미생물 균총이 변화한다는 이전 연구를 참고했을 때[10], 우점종의 차이가 실험 대상자의 연령대 및 환경적인 요인에서 기인했을 것으로 생각된다.

기관절개군에서 비기관절개군에 비해 높은 상대풍부도를 보였던 균주는 문 수준에서 *Proteobacteria*, *Fusobacteria*였으며, 속 수준에서 *Neisseria, Fusobacteria, Porphyromonas*인 것으로 확인되었다. *Neisseria*속을 포함한 *Proteobacteria* 문은 건강한 사람의 폐에서도 발견되지만 천식 등의 질환에서 증가한다는 것이 밝혀졌으며[21], *Fusobacteria*속과 *Porphyromonas*속 역시 호흡기에서 병원균으로 작용할 수 있는데, 특히 낭포성섬유종 환자에게서 증가되는 양상을 보이는 것으로 확인되었다[22].

한편 비기관절개군에서 기관절개군에 비해 높은 상대풍부도를 보였던 균주는 문 수준에서 *Firmicutes*였으며, 속 수준에서 *Prevotella, Veillonella*인 것으로 확인되었다. *Firmicutes*의 경우 건강한 사람의 폐에서 주로 발견된다고 알려져 있으며[23], *Prevotella*와 *Veillonella* 또한 천식 및 만성폐쇄성기관지염 환자와 비교하였을 때 건강군에게서 우점하는 것으로 확인되었다[24].

건강한 사람의 하부 기도는 *Prevotella, Streptococcus, Veillonella, Neisseria, Haemophilus, Fusobacterium* 등이 우점한다고 알려져 있다[2]. 이러한 우점종을 포함한 호흡기계에 존재하는 다수의 미생물들은 기회 감염성을 가지고 있어 유익균과 병인균으로 명확히 구분하기 어렵다. 따라서 최근에는 특정 질환과 특정 미생물과의 상관관계 뿐만 아니라 숙주의 면역기능과 호흡기 미생물, 장내 미생물과의 상관관계에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[25].

이번 연구에서 기관절개군이 비기관절개군에 비해 만성호흡기계 질환 발생 시 증가한다고 알려진 *Neisseria, Fusobacteria, Porphyromonas*가 우세한 것이 확인되었다(Fig. 4). 하지만 본 연구에 참여한 기관절개군 환자들은 기관절개 후 1년 이상 경과하였으며, 항생제 등의 치료제를 투약하지 않는 안정된 상태로 비기관절개군과 임상 증상이나 폐기능 저하 등을 비교하기는 어려워 추후 진행될 연구에서는 염증 마커를 통해 호흡기계 면역상태 등의 차이를 함께 확인해야 할 것으로 생각된다.

결론

본 연구는 외기를 일차적으로 걸러주는 상기도의 작용이 생략된 채 하기도로 직접 호흡하는 성인 기관절개 환자들의 미생물을 분석하기 위해 시행된 탐색 연구로 비기관절개군과의 미생물 분포의 차이를 밝혔다는 점, 기도절개군에서 비기관절개군에 호흡기 질환에서 병원성으로 알려진 균주의 비율이 높은 것으로 확인되어 비기관절개군에 비해 기회감염의 위험이 높을 수 있다는 가능성을 확인했다는 점에서 그 의의가 있다.

하지만 이번 연구는 추후 본 연구를 위한 탐색 연구로서 대상자 수가 부족하다는 점, 객담 수집을 위한 방법으로 기관지 내시경을 통해 직접으로 폐에 접근하는 BAL이 아닌 tracheal aspirates 및 expectorated sputum 등 간접적인 방법을 사용하였기 때문에 오염의 위험이 존재한다는 점, 기관절개군과 비기관절개군에서 객담을 수집한 방법이 달

라 표본의 위치적 차이가 발생할 수 있다는 점, 영상의학적 소견 및 병력 외에 면역 상태 등을 확인하지 못했다는 점에서 그 한계가 존재한다. 추후 BAL을 이용한 객담 수집을 통해 오염의 위험을 최소화하고, 미생물 외에 여러 마커를 함께 분석함으로써 구체적인 염증상태를 확인할 수 있는 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(NRF-2019R1A2B5B01070365)과 한국식품연구원의 주요연구사업(E0170602-02)의 연구비 지원으로 이루어졌음.

References

1. Moffatt MF, Cookson WO. The lung microbiome in health and disease. Clinical Medicine (London, England). 2017 ; 17(6) : 525-9.
2. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. PloS One. 2010 ; 5(1) : e8578.
3. Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. Nature Reviews Microbiology. 2017 ; 15(5) : 259-70.
4. Bösel J. Tracheostomy in stroke patients. Curr Treat Options Neurol. 2014 ; 16(1) : 274.
5. McGrath B, Lynch J, Wilson M, Nicholson L, Wallace S. Above cuff vocalisation: A novel technique for communication in the ventilator-dependent tracheostomy patient. J Intensive Care Soc. 2016 ; 17(1) : 19-26.
6. Pérez-Losada M, Graham RJ, Coquillette M, Jafarey A, Castro-Nallar E, Aira M, et al. Tracheal microbiota in patients with a tracheostomy before, during and after an acute respiratory infection. Pediatr Infect Dis J. 2018 ; 37(11) : e269-e71.
7. Pérez-Losada M, Graham RJ, Coquillette M, Jafarey A, Castro-Nallar E, Aira M, et al. The temporal dynamics of the tracheal microbiome in tracheostomised patients with and without lower respiratory infections. PLoS One. 2017 ; 12(8) : e0182520.
8. Shenoy MD, Shetty KP, Shetty JP. Diagnostic accuracy of bronchoalveolar lavage in lung lesions. APALM. 2018 ; 5(1) : A57-9.
9. Schnabel RM, van der Velden K, Osinski A, Rohde G, Roekaerts PM, Bergmans DC. Clinical course and complications following diagnostic bronchoalveolar lavage in critically ill mechanically ventilated patients. BMC Pulm Med. 2015 ; 15(1) : 107.
10. Midulla F, Nenna R. Bronchoalveolar lavage: indications and applications. In: Priftis KN, Anthracopoulos MB, Eber E, Koumbourlis AC, Wood RE, editors. Paediatric bronchoscopy. Vol. 38. Basel : Karger. 2010 : 30-41.
11. Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. Expert Rev Respir Med. 2011 ; 5(6) : 809-21.
12. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJ, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. American journal of respiratory and critical care medicine. Am J Respir Crit Care Med. 2014 ; 190(11) : 1283-92.
13. Cameron JL, Reynolds J, Zuidema GD. Aspiration in patients with tracheostomies. Plast Reconstr Surg. 1973 ; 136(1) : 68-70.
14. Epstein SK. Late complications of tracheostomy. Respir Care. 2005 ; 50(4) : 542-9.
15. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. Microorganisms. 2019 ; 7(1) : 14.
16. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, DeSantis TZ, Baek MS, Liu J, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. J Allergy Clin Immunol. 2011 ; 127(2) : 372-81. e3.
17. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, Ahrens RC, Chmiel JF, Clancy JP, et al. Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. Eur Respir J. 2017 ; 50(5) : 1700832.
18. Mika M, Nita I, Morf L, Qi W, Beyeler S, Bernasconi E, et al. Microbial and host immune factors as drivers

of COPD. ERJ Open Res. 2018 ; 4(3).
19. Hudcova J, Craven DE. Ventilator-associated pneumonia. Siempos IL, editor. Hospital-acquired pneumonia. London : Future Medicine. 2013 : 49-66.
20. Hunter JD. Ventilator associated pneumonia. BMJ. 2012 ; 344 : e3325.
21. Pulvirenti G, Parisi GF, Giallongo A, Papale M, Manti S, Savasta S, et al. Lower airway microbiota. Front Pediatr. 2019 ; 7 : 393.
22. Bittar F, Rolain JM. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2010 ; 16(7) : 809-20.
23. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. Am J Respir Crit Care Med. 2013 ; 187(10) : 1067-75.
24. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Søndergaard JN, Musavian HS, Butt TM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. PLoS One. 2012 ; 7(2) : e31976.
25. Mathieu E, Escribano-Vazquez U, Descamps D, Cherbuy C, Langella P, Riffault S, et al. Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma. Front Physiol. 2018 ; 9 : 1168.