대한임상미생물학회지 1998:1;1-3

*Helicobacter pylori*의 항균제 감수성검사

강정옥

한양대학교 의과대학 임상병리과학교실

머리글

Helicobacter pylori(H. pylori) 감염이 소화성 궤양의 중요한 유발인자로 밝혀지면서 소화성 궤양의 치료에 일대 혁신이 생기게 되었다. 위산분비를 억제시키는 전통적인 소화성 궤양의 치료 일년 후 재발율은 약 90%에 이르나 *H. pylori*를 박멸시키는 항균제로 치료하면 일년 후의 재발율은 20% 미만이라고 보고되었다. 1994년 미국의 NIH는 *H. pylori*로 감염된 모든 소화성 궤양환자는 항균제로 치료하도록 권장하였으며 현재 가장 널리 사용되는 치료법은 bismuth, metronidazole, amoxicillin의 삼제요법(triple therapy)으로 박멸률이 91%에 이르나, metronidazole에 내성인 균주에 의한 감염일 경우에 삼제요법의 박멸률이 65%로 떨어진다고 한다. 그러므로 metronidazole에 내성인 균주에 감염된 경우에는 metronidazole 대신 clarithromycin이 권장된다.

필자는 3년여 *H. pylori*를 배양하고 metronidazole과 clarithromycin에 대한 항균제 감수성검사를 시행해 오고 있는데, 그동안 미생물분야에 경험이 많지 않은 임상병리전문의들과 소화기내과의사들로부터 *H. pylori*의 배양과 항균제 감수성검사에 대한 문의를 여러 차례 받은 바 있다. *H. pylori*에 관심이 많은 소화기내과의사들이 중심이 되어 *H. pylori* 연구회도 발족되었고(1997년), 한국에서 분리된 *H. pylori* 균주는 주치료제인 metronidazole에 대한 내성률이 46.2%로 높으므로 향후 *H. pylori*의 배양 및 항균제 감수성검사에 대한 요구는 점차 증가되리라 추정된다. 그러므로 아직 이를 실시하고 있지 않은 임상병리과에서는 *H. pylori*의 배양과 항균제 감수성검사에 대한 준비를 해 둘 필요가 있다고 생각된다. 이에 연자는 이 균의 배양과 항균제 감수성검사에 초점을 맞추어 실제 업무에 도움이 되기를 바라며 연자의 경험을 나누고자 한다.

위생검조직의 *H. pylori* 배양법

경험이 많은 검사실의 배양 예민도는 90% 이상이지만 시간이 많이 걸리고 번거롭고 비용도 많이 드는 편이므로 진단을 위하여 배양을 할 필요는 없다고 생각된다. 배양법보다 변법 그람염색법이나 rapid urease검사의 예민도가 더 높고 검사 결과의 보고도 훨씬 빨리 할 수 있다. 다만 항균제 감수성검사를 하기 위하여 또는 분리된 균주를 보존하여 보다 상세히 연구할 목적이라면 배양을 해야할 것이다.

검체 채취, 운반 : 내시경으로 위 전정부와 체부에서 각각 한 조각씩 위점막을 채취한다음 phosphate buffered saline(PBS)나 Stuart's 수송배지에 넣어 임상병리과로 보낸다. 검체는 4시간 이내에 처리한다.

배 지 : 항균제가 들어 있지 않은 비선택배지에는 5% 면양혈액배지, 7% 말혈액배지, egg yolk emulsion(EYE)배지, chocolate배지 등이 있으며, 비선택배지에 항균제(vancomycin 10mg/L, cefsulodin 5mg/L, trimethoprim 5mg/L, amphotericin B 5mg/L)를 첨가하여 선택배지를 만든다. 저자는 비선택배지로 5% 면양혈액배지를, 선택배지로 7% 말혈액배지를 자가 제조하여 사용해 왔으나 최근에는 말혈액을 구입하기가 번거로와서 비선택배지만 사용하고 있다. 내시경 소독을 철저히, 자주 하도록 권유하여 오염균을 줄이면 선택배지를 사용하지 않아도 오염균이 크게 문제되지 않는 것 같으나 가능하면 선택배지를 사용하는 것이 권장된다.

접종 및 배양 조건 : 운반 용기에 든 위조직 두 조각을 microfuge로 옮긴 다음 멸균된 pestle로 생검조직을 간 후 갈아진 조직을 비선택배지와 선택배지에 각각 접종시킨다. 세균배양에 일상적으로 사용하는 4획선식을 사용해도 되나 요배양시의 접종방식을 사용하는 것이 더 신속하고 편리하다. 접종이 끝난 배지를 GasPak jar에 넣고 상품화된 미호기성 조건 발생 kit(CampyPak Plus, Becton Dickinson, USA)를 작동시킨 후 jar의 뚜껑을 밀폐한 다음 37℃, CO_2 배양기에 넣어 3일간 배양시킨다. 삼일 후에 GasPak jar를 열고 균집락을 관찰한다. 직경이 0.1-0.5mm 정도인 투명한 균집락이 관찰되면 동정에 들어 간다. 의심되는 균집락이 보이지 않으면 다시 미호기성 조건에서 3일-4일간 더 배양시킨다음 관찰한다.

동 정 : *H. pylori*로 의심되는 균집락을 그람염색하여 그람 음성의 만곡된 간균을 확인하고, urease검사, catalase검사, oxidase검사에서 모두 양성이면 *H. pylori*임을 확인한다.

계대배양과 보존 : *H. pylori*로 의심되는 균집락이 관찰되면 즉시 계대배양을 해야 한다. 한 개의 균집락에서 균을 따서 비선택배지에 여러 방향으로 획선을 그어 37℃, 미호기성 조건으로 배양한다. 몇 개의 균집락에서 균을 따서 각각 다른 비선택배지에 심는다. 계대배양시에는 5% 면양혈액배지를 사용하는 것이 가장 실용적이다. EYE배지를 쓰면 균이 자라는 속도가 약간 빠르고 균집락의 크기도 크나 coccoid form이 잘 생겨 다음 계대배양시 잘 자라지 않는다. 3일 후 균이 자라면 면봉으로 수거하여 glycerol 15%가 든 BHI배지에 부유시킨 후 -70℃에 보존한다. 일년이상 보존하려면 액체 질소에 보관한다.

항균제 감수성검사

감수성검사 대상 항균제는 미국의 FDA에서 공인된 *H. pylori* 치료법에 가장 많이 사용되는 metronidazole, clarithromycin, amoxicillin 등의 항균제가 대상이 되나 metronidazole의 내성율이 전 세계적으로 높고(나라에 따라 10%에서 90%까지로 다양하다.) 한국의 경우에도 46.2%로 높으므로 일상적인 감수성검사가 필요하다. 그러나 amoxicillin에 내성인 균주는 드물다고 하며 또한 clarithromycin의 내성율은 한국에서는 2.2%로 낮으므로 amoxicillin과 clarithromycin에 대한 일상적인 감수성검사는 불필요하다고 생각된다. 그러므로 metronidazole에 대한 항균제 감수성검사만 시행해도 될 것으로 생각되어 이 약제에 대한 감수성검사법에 대하여 기술하려고 한다.

*H. pylori*에 대한 NCCLS에 등재된 표준 감수성검사 방법은 아직 없는 실정이나 이에 관한 많은 연구 보고 및 저자의 연구와 경험을 바탕으로 인력과 경제성 등을 고려하여 가장 실용적인 방법을 소개하고자 한다.

*H. pylori*에 대한 항균제 감수성검사방법은 일반세균의 감수성검사와 마찬가지로 액체배지희석법, 한천배지희석법, 디스크확산법, E test 등이 있다. 한천배지희석법은 배지제조가 번거롭고 몇 개의 균주로 시행하는 일상검사법으로는 부적합하다. 디스크확산법은 연구자마다 성적이 다양하고 디스크의 metronidazole 용량도 표준화 되어 있지 않고 액체배지희석법이나 한천배지희석법에 비하여 정확도나 정밀도가 떨어지므로 일상검사법으로는 추천할 수가 없다. 그러나 clarithromycin의 경우에는 디스크확산법과 액체배지희석법이 100% 일치하였으므로 디스크확산법을 사용해도 좋다. E test는 간편하고 비교적 정확하며 최소억제농도로 나타낼 수 있으므로 추천할만한 검사지만 가격이 비싼점이 문제이다. 액체배지희석법은 96-well plate를 사용하는 액체배지 미량희석법이 실용적이나 매 검사때 마다 각 농도의 항균제 용액을 제조하는 것이 상당히 번거롭다. 연자의 실험 결과 최종 항균제 용액의 10배 농도 용액을 96-well plate에 미리 분주한 다음 밀봉하여 -20℃에 냉동보관하면 6개월까지도 약효의 손실이 없는 것으로 관찰되었다. 항균제 용액이 미리 분주되어 있고 만들어 놓은 BHI 액체배지가 있으면 균부유액만 만들면 되므로 액체배지 미량희석법이 용이해진다.

Table 1. Contents of nonselective egg yolk emulsion agar

Ingredient	Amount
Columbia agar(Oxoid, UK)	39 g
Egg yolk emulsion(Home-made)	100 mL
IsoVitaleX(Becton Dickinson, USA)	10 mL
Triphenyltetrazolium chloride(Sigma, USA)	40 mg
Distilled water	890 mL

1. 액체배지 미량희석법

① 멸균된 96-well plate(round bottom)의 각 well에 fetal bovine serum(FBS) 5%와 triphenyltetrazolium 40 mg/mL이 든 brain heart infusion(BHI) broth를 160 uL씩 각 well에 분주한다.

② Metronidazole 용액 20 uL(10배 용액) 씩을 각 well에 가하여 최종 농도가 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ug/mL이 되게 한다(양성대조 well에는 넣지 않는다).

③ 5% 면양혈액배지에서 3일간 계대배양시킨 균집락을 면봉으로 수거하여 FBS 5%가 든 BHI 액체배지에 부유시켜 McFarland No. 2(6×10^{8}/mL)에 맞춘다.

④ 균부유액을 20 uL씩 각 well에 분주한다(음성대조 well에는 넣지 않는다).

⑤ 미호기성 조건, 37℃에서 3일 간 배양시킨 후 최소억제농도를 판독한다.

상기 과정을 시행하는 동안 *H. pylori*의 공기 노출시간을 최소한으로 하도록 유의한다.

2. E test

E test를 위한 한천배지는 5% 면양혈액배지를 사용할 수도 있으나 균집락의 크기가 작아서 빽빽히 자라지 않는다. 그러나 EYE배지를 사용하면 균집락의 크기가 커서 배지의 표면에 빽빽히 자라므로 억제대와 E test strip과의 교차점이 뚜렷이 나타나 최소억제종도를 판독하기가 용이하다.

액체배지 미량희석법에 사용한 균부유액을 면봉에 충분히 묻힌 후 EYE배지에 골고루 여러 방향으로 바른다. 물기가 배지에 흡수되도록 몇분 간 방치한 후 metronidazole strip을 놓는다. 미호기성 조건, 37℃에서 3일 간 배양시킨 후 최소억제농도를 판독한다.

참고문헌

1. Lee A and Megrad F eds. *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research. 1st ed. London: WB Saunders, 1996.*
2. Buck GE. *Camylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin Microbiol Rev 1990;3:1-12.*
3. Dunn BE, Cohen H, Blaser M. *Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-41.*
4. Westblom T, Madan E, Midkiff B. *Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of Helicobacter pylori. J Clin Microbiol 1991;29:819-21.*
5. **김신경, 김은숙, 박일규, 강정옥, 최태열**. *Helicobacter pylori* **감염의 진단방법 및 배양배지에 관한 연구**. **대한임상병리학회지** *1997;17:1060-7.*