

Helicobacter pylori 배양을 위한 선택배지의 비교

백인기, 김용순, 신원창*, 이진호*

인제대학교 상계백병원 임상병리과, 내과*

Comparison of Selective Media for Culture of *Helicobacter pylori*

In Ki Paik, M.D., Yong Soon Kim, M.D., Won Chang Shin*, M.D., and Jin Ho Lee*, M.D.

Department of Clinical Pathology & Internal Medicine*, Sanggye Paik Hospital,
Inje University, Seoul, Korea

Backgrounds : Culture of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) from gastric biopsy specimens is a standard method with high specificity among *H. pylori* diagnostic tools and is also essential for antibiotic susceptibility test. The authors compared 5 selective media for *H. pylori* culture and tested fresh human serum instead of fresh animal blood as a media composite.

Methods : Gastric biopsy specimens from endoscopic examination were obtained from 50 patients (gastric ulcer:33, duodenal ulcer:12, stomach cancer:5) and they were finely minced with a tissue grinder. Specimens were inoculated onto 5 media (1. Columbia agar with 5% sheep blood, 2. Columbia agar with 10% human serum, 3. Thayer-Martin agar with 5% sheep blood, 4. T-M agar with 10% human serum, 5. T-M agar with 10% hemoglobin) and cultured for 3~7 days under microaerophilic condition. Gram stain, oxidase, catalase, and urease tests, were undertaken on typical colonies for diagnosis of *H. pylori*. Contamination by other organisms, number and size of *H. pylori* colonies were compared for each media.

Results : Positive culture rate of *H. pylori* was not significantly different among 4 media except T-M agar with 10% hemoglobin. However T-M agar with 10% fresh human serum was considered as the best composition for culture of *H. pylori* because it had the least contaminating organisms and produced the largest colony sizes.

Conclusions: These findings suggest that T-M agar with 10% fresh human serum can replace columbia agar with 5% sheep blood which has been commonly used for culture of *H. pylori* from gastric biopsy specimens. Fresh human serum, which is easily obtained in the clinical laboratory, can replace animal bloods in making media for *H. pylori*.

(Korean J Clin Microbiol 2001;4:11-15)

Key words : *Helicobacter pylori*, Culture, Media

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 인체 위 점막에 서

*본 논문은 1998년도 인제 연구장학재단의 연구비 보조에 의한 것임.

접수번호 : CM 4-1-1

교신저자 : 백인기

(139-707) 서울시 노원구 상계7동 761-1
인제대학교 의과대학 상계백병원 임상병리과
TEL: 02) 950-1227 FAX: 02)950-1244
E-mail: ikpaik@sanggyepaik.or.kr

식하며 만성 위염, 소화성 궤양 등과 밀접한 관계가 있다[1-6]. 진단방법은 위 생검의 조직검사, 신속 요소분해(CLO)검사, 배양, 혈청학적 검사, PCR 및 요소호기검사(urea breath test) 등이 있다[7-9]. 특히 배양법은 배양 조건이 까다롭고 시간이 많이 걸리지만 특이성이 높으며 항균제 감수성검사를 위해서는 필수적이다[10].

위 생검 조직에서 *H. pylori* 배양은 신선한 면양혈액이나 말혈액 등 동물혈액 및 항균제가 포함된 선택배

지를 사용해야 효과적이며 미호기성(micro-aerophilic) 환경이 필요하여, 배양이 힘든 균 중의 하나이다[10-12].

본 연구에서는 우리 나라 여건상 적절한 배양조건을 찾기 위하여 몇 가지 선택배지들과 함께 현재 각 실험실에서 구하기 까다로운 신선 동물혈액과 그 대체 물질들을 비교 검토하여 보았다.

대상 및 방법

1. 대상

연구는 1999년 4월부터 9월까지 6개월간 위 내시경 검사상 소화성 궤양이 의심되는 50명을 대상으로 실시하였으며, 후향적으로 조사된 진단은 위궤양(33명), 십이지장궤양(12명) 및 위암(5명)이었다.

2. 배지 제조

다섯 가지 종류의 배지를 사용하였으며 각 조성성분은 다음과 같다.

또한 신선 면양혈액은 Union Laboratory (Korea)에서

순서	기본 배지	혈액 제재	첨가 물질
1	Columbia agar	5% sheep blood	Dent supplement*
2	"	10% human serum	"
3	Thayer-Martin agar	5% sheep blood	Supplement I & II†
4	"	10% human serum	"
5	"	10% hemoglobin	"

*Dent selective supplement (Oxoid, Hampshire, UK) : Vancomycin 10.0 mg/L, Cefsulodin 5.0 mg/L, Trimethoprim 5.0 mg/L, Amphotericin B 5.0 mg/L ; † Supplement (Merck, Darmstadt, Germany), I : Vancomycin 5.0 mg/L, Trimethoprim 5.0 mg/L, Colistin 7.5 mg/L, II : Growth promoting agents.

구입하였으며, 신선 인혈청(human serum)은 배지제조 전날 상계백병원 면역혈청부에서 모은 pooled serum을 사용하였다.

3. 검체 채취 및 배양

위 내시경 생검조직 1개를 phosphate buffered saline (pH7.3±0) 2 ml에 담겨 놓고 생검 후 3시간 이내에 조직 분쇄기(Millipore, Watford, UK)로 잘게 갈아서 상기 다섯 가지 종류의 배지에 접종한 후, 물에 젖은 거즈를 바닥에 깔은 GasPak jar (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)에 넣고 CampyPak Plus™ (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)를 사용하여 미호기성 상태를 조성하였다. 37℃ 항온기에 넣어 6~7일까지 배양하며, 3일, 6일 후 육안 관찰하여 무색투명한 작은 물방울 모양의 특징적인 집락이 관찰되면, 그람염색을 실시하여 그람음성의 만곡된 간균인 경우 oxidase, catalase 및 urease검사에서 양성이면 *H. pylori*로 동정하였다.

결 과

1. *H. pylori* 양성율

사용된 선택배지 다섯 가지 중 *H. pylori* 양성율은 각각 5% 면양혈액을 첨가한 Columbia 배지에서 74%, 10% 인혈청을 첨가한 Columbia 배지에서 70%, 5% 면양혈액을 첨가한 T-M 배지에서 74%, 10% 인혈청을 첨가한 T-M 배지에서 74%, 10% 혈색소를 첨가한 T-M 배지에서 40%로서, hemoglobin을 섞은 T-M 배지에서만 유의하게 낮게 ($p<0.01$) 배양되었고 나머지 배지들(1~4)간에는 배양율에 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

2. *H. pylori* 집락의 수 및 직경 비교

각 배지 군에서 관찰된 집락의 수는 6일 후 상기 4배

Table 1. Comparison of *Helicobacter pylori* culture in various media from gastric biopsy specimens

Media	Culture	
	Positive cases/total	Positive rate(%)
Columbia agar with 5% sheep blood	37/50	74
Columbia agar with 10% human serum	35/50	70
T-M agar with 5% sheep blood	37/50	74
T-M agar with 10% human serum	37/50	74
T-M agar with 10% hemoglobin*	20/50	40

*Hemoglobin (Difco laboratory, Detroit, MI, USA)

Abbreviation : T-M, Thayer-Martin

Table 2. Mean colony size of *Helicobacter pylori* on four selective media

혈액 제제 기본 배지 size (mm)	Diameters (mm)/6 days incubation			
	sheep blood		human serum	
	Columbia agar	T-M agar	Columbia agar	T-M agar
	0.8	0.8	1.0	1.5

Abbreviation : See Table 1.



Fig. 1. *Helicobacter pylori* colonies at 6 days on Columbia agar with 5% sheep blood.

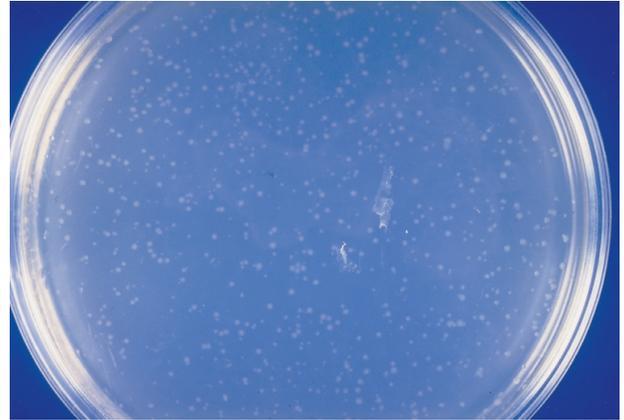


Fig. 2. *Helicobacter pylori* colonies at 6 days on Thayer-Martin agar with 10% human serum, showing bigger colonies compared with Columbia agar containing 5% sheep blood.

지(1~4)에서 모두 다수(400 CFU이상)로서, 수에는 큰 차이가 없었으나 집락의 직경은 10% 인혈청을 첨가한 T-M 배지에서 가장 컸다(Table 2, Fig. 1 and 2).

3. 배지 오염균

오염균의 집락수는 6일 배양 후 Columbia agar에서는 평균 10 CFU 정도였으나, T-M agar에서는 대부분 음성이었다.

고 찰

*H. pylori*는 만성 위염 및 소화성 궤양의 발병 요인으로 잘 알려져 있으며, 위암의 발병 요인으로도 주목받고 있다[1-6]. *H. pylori*감염의 진단법에는 내시경으로 채취된 조직을 이용한 신속 요소분해검사법, 변형 그람염색, 배양법, 중합효소 연쇄반응법(PCR) 등이 있으며, 비침습적 방법으로는 혈청학적 검사와 동위원소를 이용한 urea breath test 등이 있다[7-9].

배양법은 까다로운 배양조건과 배양속도가 느린 이 세균의 특성 때문에 배양이 용이하지 않으며, 또한 생검조직이 오염되면 세균분리가 더욱 어렵다[10]. 그러나 최근 들어 항균제 내성균주가 증가되는 추세이므로 항균제 감수성 검사의 필요성이 커지고 있으며 항균제 감수성 검사를 위해서는 세균배양이 필수적이다[12-

14]. 위 생검조직에서의 배양 양성율은 연구자에 따라 다르며 김 등[10]은 48%, 이 등[15]은 86%, 다른 연구자들은 77~94% [16-17]의 양성율을 보고하였다.

배양배지는 Marshall 등[18]이 처음 보고할 때는 7% 말혈액이 들어있는 brain-heart infusion chocolate agar를 사용하였고, 그 후 비선택배지로 5% 면양 또는 7% 말혈액이 들어 있는 tryptic soy agar, brain-heart infusion agar, modified chocolate agar 등이 사용되어 왔고, 오염이 많은 검체의 선택배지로는 Skirrow medium, Dent's medium, modified T-M medium 또는 pylori medium 등이 사용되어 왔다[11,19,20].

H. pylori 배양은 오염이 심하여 처음부터 선택배지를 사용하는 것이 효과적이며[10,12] Piccolomini 등[11]은 선택배지로서 항균제가 포함된 egg yolk emulsion (EYE) 배지가 단일 배지로서는 가장 분리율이 높고(95%), 선택배지로서의 EYE 배지와 비선택배지인 modified chocolate agar를 동시에 사용하면 가장 분리율이 높다(100%)고 보고하였다. EYE 배지는 항균제를 포함한 선택배지 또는 포함치 않은 비선택배지, 양쪽 모두로 사용될 수 있는데[21], 김 등[10]은 비선택배지로서의 EYE 배지는 균의 성장속도도 빠르고 집락의 크기도 크나 오염이 심하며 coccoid form이 잘 생겨서 계대배양이 잘 되지 않는다고 보고하였으며, 선택배지로는 항균제를 첨가한 7% 말혈액 배지에서의 분리율이 가장 높다고 보고하였다.

본 연구에서는 자가 제조한 egg yolk emulsion을 포함한 여러 성분이 들어있는 EYE 배지대신에 임균 (gonococcus) 배지로서 국내에서 흔하게 사용되는 T-M 배지를 사용하여 *H. pylori* 배양 실험을 시도하였다. Piccolomini 등[11]은 10% hemoglobin powder를 포함한 변형 T-M 배지가 EYE 배지에 비하여 *H. pylori* 배양 양성율이 낮다고(74%) 보고하였으며 본 연구에서도 변형 T-M 배지(5번)는 대조군인 5% 면양혈액배지에 비하여 배양 양성율이 낮았다.

그러나 변형 T-M 배지의 한 성분인 10% hemoglobin 대신에 동물혈액이나 인혈청을 첨가하면 배양 양성율을 높일 수 있을 것으로 사료되었으며, 또한 T-M 배지는 잡균의 오염이 가장 적은 배지[11]이기 때문에 오염 방지에도 효과가 높을 것으로 사료되었다.

또한 말혈액, 양혈액 등 신선 동물혈액성분이 *H. pylori* 배지 조성성분 중 중요한 성분이라고 생각되었으나 Fauchere[22]는 배지성분 중 동물혈액은 송아지, 말 또는 인혈청으로 대체될 수 있다고 주장하였고, 본 실험에서는 국내에서 쉽게 구하기 어려운 신선 동물혈액 대신에 임상병리과에서 쉽게 구할 수 있는 신선 인혈청으로 이를 대체하는 실험을 시도하였다. 그 결과 본 실험에서는 T-M 배지에 10% 신선 인혈청과 첨가물(supplement)을 섞은 조성이 잡균의 오염도 제일 낮고 *H. pylori* 집락의 크기도 제일 커서 가장 좋은 조건으로 사료되었으며, *H. pylori* 배양에서는 동물혈액 대신에 신선 인혈청을 대체 사용할 수 있다고 생각된다.

요 약

배 경 : 위 생검 조직에서 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 배양법은 다른 진단방법에 비하여 특이성이 높은 표준방법이며 항균제 감수성 검사를 위해서는 필수적이다. 이에 저자들은 다섯 가지 선택배지 조성을 비교 검토하였으며, 또한 구하기 힘든 동물혈액 대신에 인혈청을 대체 사용할 수 있는지 비교 검토하였다.

방 법 : 1999년 4월부터 9월까지 6개월간 소화성 궤양으로 의심되는 50명의 위 생검조직을 조직 분쇄기로 잘게 갈아 다섯 가지 배지 (1. Columbia agar with 5% sheep blood, 2. Columbia agar with 10% human serum, 3. Thayer-Martin agar with 5% sheep blood, 4. T-M agar with 10% human serum, 5. T-M agar with 10% hemoglobin)에 접종하여 미호기상태를 만든 후 3~7일간 배양하여 특징적인 집락이 관찰되면 그람염색, oxidase, catalase, urease 검사를 실시하여 진단하였으며, 잡균의 오염상태 및 집락의 크기 등을 비교 검토하였다.

결 과 : 10% hemoglobin을 첨가한 T-M 배지 이외에 나머지 배지에서는 양성 배양율에 유의한 차이가 없었으며, T-M 배지에 10% 신선 인혈청을 첨가한 배지가 잡균의 오염도가 가장 낮고 집락의 크기도 제일 커서

본 실험에서의 최적 배지로 사료되었다.

결 론 : *H. pylori* 선택배지로 기존에 흔하게 사용되던 면양혈액 또는 말혈액이 포함된 Columbia agar 대신에 10% 신선 인혈청을 첨가한 T-M 배지를 사용하여 *H. pylori*를 분리 동정할 수 있다. 즉 동물혈액 대신에 손쉽게 구할 수 있는 신선 인혈청을 대체 사용할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Buck GE. *Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol Rev* 1990;3:1-12.
2. 박경남, 기춘석, 김정목, 정용훈, 김경희, 조양자 등. 위염 및 소화성 궤양의 병인과 *Campylobacter pylori*와의 상관관계에 관한 연구. 대한내과학회지 1988; 34:64-73.
3. 홍미재, 강진호, 김유경, 박영철, 이만호, 정을순 등. 상부 위장관 질환에 있어 *Campylobacter pylori*에 대한 연구. 대한소화기병학회지 1989;21:104-109.
4. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, N Orentreich et al. *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med* 1991; 25:1127-31.
5. Nomura A, Stemmermann GN, Chyon PH, Kato I, Guillermino I, Perez P, Blaser MJ. *Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med* 1991;325:1132-6.
6. Hansson LE, Eugstrand L, Nyren O, Evans DJ, Lindgren A, Bergstrom R et al. *Helicobacter pylori infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. Gastroenterology* 1993;105:1098-1103.
7. Peterson WL. *Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. N Engl J Med* 1991;324: 1043-8.
8. Gray SF, Wyatt JI, Rathbone BJ. *Simplified techniques for identifying Campylobacter pyloridis. J Clin Microbiol* 1986;39:1279.
9. Graham DY, Evans DJ, Alpert LC, Klein PD, Evans DG, Operkum AR, Boutton TW. *Campylobacter pylori detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. Lancet* 1987;1:1174-7.
10. 김신경, 김은숙, 박일규, 강정옥, 최태열. *Helicobacter pylori* 감염의 진단배지 및 배양 배지에 관한 연구. 대한임상병리학회지 1997; 17: 1060-66.
11. Piccolomini R, Bonaventura GD, Festi D, Catomo G, Larterza F, Neri M. *Optimal combination of media for primary isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol* 1997;35:1541-44.
12. 강정옥. *Helicobacter pylori*의 항균제 감수성 검사.

- 대한임상미생물학회지 1998;1:1-3.
13. Vasquez A, Valdez Y, Gilman RH, McDonald J, Westblom TU, Berg D, et al. *Metronidazole and Clarithromycin resistance in Helicobacter pylori determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format.* J Clin Microbiol 1996;34:1232-4.
 14. European study group on antibiotic susceptibility of Helicobacter pylori. Results of a multicentre European survey in 1991 of metronidazole resistance in Helicobacter pylori. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:777-81.
 15. 이미애, 허정원. *Helicobacter pylori* 감염의 진단법 비교: 조직검사, 신속 요소 분해검사, 배양, 혈청학적 검사 및 중합 효소 연쇄반응, 대한임상미생물학회지 1998;1:44-50.
 16. Fabke R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, et al. *Polymerase chain reaction assay for the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests.* Gut 1994;35:905-8.
 17. Weiss J, Mecca J, Da Silver E, Gassner D. *Comparison PCR and other diagnostic techniques for detection of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients.* J Clin Microbiol 1994;32:1663-8.
 18. Warren JR and Marshall B. *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.* Lancet 1983;1:1273-5.
 19. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. *Comparison of agar based media for primary isolation of Helicobacter pylori.* J Clin Pathol 1995;48:14-6.
 20. Dent JC, McNulty CAM, *Evaluation of a new selective medium for Campylobacter pylori.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;7:555-68.
 21. Westblom TU, Medan E, Mickiff BR. *Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of Helicobacter pylori.* J Clin Microbiol 1991;29:819-21.
 22. Fauchere. *Bacteriological characteristics and diagnosis of Helicobacter pylori. Technical review, Sanof Diagnostics Pasteur 1999;6:1-8.*