

*Campylobacter jejuni*의 Hippurate 가수분해 검출을 위한 Disk 법의 유용성

어 영, 박순덕, 조현미, 정안숙, 이현교, 이미경, 윤갑준

연세대학교 원주의과대학 임상병리학과교실

Usefulness of a Disk Method for Detection of Hippurate Hydrolysis by *Campylobacter jejuni*

Young Uh, Soon Duk Park, Hyun Mi Cho, Hyeun Gyeo Lee, An Suk Jeoung, Mi Kyung Lee, and Kap Jun Yoon

Department of Clinical Pathology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background: The test for hippurate hydrolysis is critical for differentiation of *C. jejuni* and other thermophilic *Campylobacter* species. So, we evaluated the disk method for detection of hippurate hydrolysis by *C. jejuni*.

Methods: Twenty-eight *Campylobacter* species isolated from stool culture were simultaneously tested with disk method for detection of hippurate hydrolysis and polymerase chain reaction (PCR) for hippuricase specific gene. Disk method was tested with difference in incubation time (2 hours vs. 4 hours), hippurate concentration (1%, 2%, and 4%), amount of ninhydrin (50 μ L vs. 100 μ L), and inoculation method (colony vs. suspension of organism adjusted by turbidity), finally, 24 types of disk methods were performed.

Results: By using hippuricase PCR method as the reference for the detection of hippurate hydrolysis, the disk method showed a sensitivity of 91.7% and a specificity of 100% when two kinds of disk methods were simultaneously performed.

Conclusions: The disk method for detection of hippurate hydrolysis is simple to use and require fewer cells than the tube method do, and should be useful as a routine diagnostic test in clinical laboratory for rapid identification of *C. jejuni*. (Korean J Clin Microbiol 2002;5(1):42-46)

Key words: *Campylobacter jejuni*, Hippuricase, PCR, Hippurate hydrolysis, Disk

서 론

*Campylobacter*는 다소 구부러진 미호기성의 그람 음성 간균으로서 사람과 동물의 중요한 병원성 세균이다. *Campylobacter*에는 아종을 포함하여 18 균종이 속해 있으며 이 중 *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*가 감염과의 관련성이 가장 높으며 사람의 *Campylobacter* 감염병은 *C.*

*jejuni*와 *C. coli*에 의한 장염이 가장 많고 *C. fetus*는 패혈증 등의 장외감염을 드물게 일으킨다[1]. 사람의 *Campylobacter* 장염은 *C. jejuni*가 95%정도로 대부분을 차지하고 *C. coli*가 3-5%를 점하며 *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* 등이 소수에서 분리된다[1-3]. *Campylobacter* 장염은 저절로 회복되는 경우가 많지만 5-10%는 치료를 하지 않으면 재발이 될 수 있으며, 간혹 급성 충수염의 증상과 유사하여 불필요한 수술을 받게 되는 원인이 될 수 있고, 면역기능저하환자에서는 장염의 합병증으로 지속적인 설사와 패혈증을 유발할 수도 있으며, 드물게 관절염, 요로감염, 뇌막염, 췌장염, 유산, 신생아 패혈증 등의 장외감염을 유발하여 사망할 수도 있다[1]. 또한 *Campylobacter*는 균종별로

접수번호 : CM 5-01-05

교신저자 : 어 영

(220-701)강원도 원주시 일산동 162

원주기독병원 임상병리과

Tel : 033) 741-1593 Fax : 033) 731-0506

E-mail : u931018@wonju.yonsei.ac.kr

항균제 감수성 양상이 다르므로[1] 임상병리과에서는 *Campylobacter*가 분리되면 항균제 감수성 시험을 보고하는 것이 바람직하다. *Campylobacter*의 항균제 감수성 시험은 표준화된 방법이 없으며 권장되는 항균제 시험 방법도 5% 말 또는 면양 혈액이 첨가된 Mueller-Hinton 배지를 이용한 액체배지법이므로 임상검사에서 통상적인 감수성 시험으로 사용하기에는 어렵다[1]. 그러므로 *Campylobacter* 감염시에는 분리된 균종의 항균제 감수성 양상에 대한 자료를 토대로 경험적 치료를 시행할 수밖에 없는 경우가 대부분이다. *Campylobacter*의 감별 동정은 매우 어려우나 다행히도 *Campylobacter* 감염 중 가장 흔한 원인균인 *C. jejuni*는 hippurate를 가수분해하는 특징이 있으므로 *Campylobacter*에 일치하는 그람염색과 집락의 특성을 보이면 hippurate 가수분해 검사를 시행한 후 양성이면 *C. jejuni*로 보고하고 hippurate 가수분해 음성이면 감별동정 시험을 추가하는 것이 효율적이다[1].

Hippurate 가수분해를 확인하는 방법은 ninhydrin 또는 ferric chloride를 지시제로 사용하는 시험관 법과 디스크 법이 있으며, 이외에도 gas-liquid chromatography 법, high performance liquid chromatography 법 등의 여러 가지가 있으나 ninhydrin 시험관법을 임상검사에서 가장 흔히 사용하고 있다[4-6]. Ninhydrin 시험관 법은 예민도가 비교적 높으나 균 접종량이 많이 필요하기 때문에 증식된 집락수가 적을 경우에는 정확한 결과를 얻기가 어렵다. 또한 *Campylobacter*의 계대배양은 고가의 선택배지가 필요하며 배양시간이 오래 걸리는 단점이 있다.

이에 저자들은 임상검사에서 *C. jejuni*의 선별동정 시험으로서 쉽게 사용할 수 있는 hippurate 가수분해 검출을 위한 disk 법의 유용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

2000년 5월부터 2001년 8월까지 대변 배양이 의뢰된 검체 중 Butzler 선택배지에서 미호기성 조건하에서 48시간 배양후 *Campylobacter*가 의심되는 집락이었던 28균주를 대상으로 hippurate disk 가수분해시험과 hippuricase 유전자에 대한 polymerase chain reaction을 시행하였다. Hippurate 가수분해시험을 위한 hippurate disk는 6 mm의 멸균 종이 disk에 1%, 2% 및 4% sodium hippurate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) 용액 25 μ L를 넣은 세 가지 종류의 디스크를 제조하였다. Hippurate disk를 이용한 가수분해 방법은 24개의 microplate well에 증류수 2 방울(100 μ L)을 넣은 후 12개의 well에는 집락 2-4개를 잘 풀어 넣고 각 4개의 well마다 1%, 2% 및 4% hippurate disk를 담그고(집락법), 다른 12개의 well에는 시험 균주를 0.5 MacFarland 탁도로 맞춘 균 부유액 두 방울 넣은 다음(탁

도법) 각 4개의 well마다 1%, 2% 및 4% hippurate disk를 담근 뒤에 35℃에서 2시간과 4시간 배양 후 각 well에 ninhydrin 시약을 1방울(50 μ L)과 2방울(100 μ L)로 나누어 첨가한 후 20분이 지난 뒤에 판독하였다. 판독방법은 색조변화가 없으면 음성, 청색으로 바뀌면 양성으로 판정하되 청색의 정도에 따라 디스크에 푸른색이 비치면 1+, 디스크의 일부분이 진한 청색을 보이면 2+, 디스크 전체가 청색으로 변하면 3+, 디스크 전체가 진한 청색으로 변하면 4+로 판정하였다.

Hippuricase PCR 시험을 위한 *Campylobacter* DNA는 proteinase K와 페놀/클로로포름법을 이용한 상용화된 제품(Easy-DNA™ kit, Invitrogen Co., USA)을 사용하여 순수분리된 1-2개의 *Campylobacter* 집락에서 추출하였다. Hippuricase 유전자 증폭을 위한 oligonucleotide 시발체의 염기서열은 forward primer는 5' -GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3' 였고 reverse primer는 5' -AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3' 였다[7]. PCR 반응 혼합물은 *Campylobacter*의 DNA 추출액 5 μ L, PCR 완충액[20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂] 5 μ L, Taq DNA polymerase (Behringer Mannheim, Germany) 2.5 U, 각각의 dNTP 200 μ M 및 시발체 20 pM을 첨가한 후 탈이온 증류수(DDW)를 가하여 총 부피가 50 μ L되게 한 후 PCR을 시행하였다. PCR 반응은 Thermocycler (Master cycler 5330, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 predenaturation으로 94℃에서 5분간 가온한 후 main cycle로 94℃ 1분, 66℃ 1분, 72℃ 1분을 25회 반복하고 끝으로 72℃에서 10분간 연장반응시켰다. PCR 반응 산물은 2% agarose gel에서 전기영동(100V, 30분)한 후 자외선하에서 735 bp 위치의 DNA 분획을 확인하였고 marker는 100 bp DNA ladder (Gibco/BRL, LifeTechnologies Inc., Gaithersburg, USA)를 사용하였다.

결 과

*Campylobacter*가 의심되는 집락이 분리된 28균주 중 hippuricase PCR에서 유전자가 검출된 균주는 24균주였고 4균주는 유전자가 검출되지 않았다. Hippuricase 유전자 검출을 기준으로 hippurate disk 법의 예민도는 24가지 방법으로 모두 시행하면 95.8%(23/24)였고 방법별로는 집락을 풀은 다음 4% hippurate disk를 첨가한 후 4시간 배양하고 2 방울의 ninhydrin시약을 첨가한 경우(4% 집락법으로 약하여 설명함)가 79.2%로 가장 높았고, 다음으로는 균 부유액을 풀은 다음 4% hippurate disk를 첨가한 후 4시간 배양하고 2 방울의 ninhydrin 시약을 첨가한 경우(4% 탁도법으로 약하여 설명함)가 70.8%였다(Table 1).

Hippuricase 유전자가 검출되지 않은 4균주 중 1균주는 24종류의 hippurate disk 법에서 모두 음성이었으며 3균주는 2-4종류의 hippurate disk 법에서 2+이하의 양성을

Table 1. Positivity of disk method for hippurate hydrolysis according to reaction conditions

Incubation time (hr)	Amount of ninhydrin	Hippurate concentration		
		1%	2%	4%
2	1 drop (50 μ L)	12.5*(8.3)†	16.7 (8.3)	33.3(25.0)
	2 drop(100 μ L)	25.0(37.5)	45.8(37.5)	54.2(54.2)
4	1 drop (50 μ L)	29.2(41.7)	50.0(45.8)	54.2(58.3)
	2 drop(100 μ L)	45.8(54.2)	70.8(62.5)	79.2(70.8)

*Numbers mean the positive rate by colony method.

† Numbers in parenthesis mean the positive rate by turbidity method.

Table 2. Results of 4% hippurate disk method (4 hr incubation, 100 μ L ninhydrin) for detection of hippurate hydrolysis

PCR	Color intensity score of hippurate disk																		
	Colony method only					Turbidity method only					Sum of colony & turbidity method								
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	5	6	7	8
+	5	1	4	5	9	7	1	5	3	8	2	-	2	7	3	-	2	1	7
-	2	2	-	-	-	2	2	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-	-

보였다. 4% 집락법에서 음성이었던 5균주 중 3균주는 4% hippurate 탁도법에서 2+이상의 양성이었다고, 4% 탁도법에서 음성이었던 7균주 중 5균주는 4% hippurate 집락법에서 2+이상의 양성반응이었다. 4% 집락법과 4% 탁도법의 두가지 검사법 중 2+이상의 양성반응을 보인 균주는 22균주로서 모두 hippurate 유전자가 검출되었으며 hippurate 유전자가 검출되지 않는 4균주 중에서 4% 집락법 또는 4% 탁도법에서 2+이상의 양성 반응을 보인 균주는 없었다. Hippurate 가수분해 시험을 4% 집락법과 4% 탁도법을 동시에 시행한 후 두가지 중 한가지에서 2+이상을 양성으로 판정하면 hippurate disk 법의 예민도는 91.7%였고 위음성은 없었다(Table 2).

고 찰

*Campylobacter*는 당을 분해하지 않고 증식이 까다로운 세균이므로 균종별 감별 동정이 매우 어렵다[1,7]. 또한 *Campylobacter*의 감별동정에 사용하는 생화학 시험들도 방법에 따라 차이가 많을 뿐만 아니라 주관적인 판독에 의존하는 시험이 많고 상품화된 동정 제품도 결과 판정이 어렵기는 마찬가지이다[1,7]. 이런 이유로 대부분의 검사실에서는 *Campylobacter*를 균종 수준까지 통상적으로 동정하지는 않으며, 발병 빈도가 높은 미국의 경우에도 *C. jejuni*로 보고된 균종 중 5-10%는 *C. coli*일 가능성이 많다고 한다[1]. 이에 일부 연구자들은 *C. jejuni*와 *C. coli* 또는 *C. lari*와 *C. upsaliensis* 등을 포함하여 검출하는 multiplex PCR이나 DNA probe 등의 분자유

전학적 방법을 사용하기도 하지만[7-9] 통상적인 동정방법으로 사용하기에는 무리가 있다. 그러므로 임상검사실에서의 통상적인 *Campylobacter* 동정방법은 집락 특성과 염색소견이 *Campylobacter*로 의심되면 hippurate 가수분해시험을 시행한 후 양성을 보이면 추가 시험없이 *C. jejuni*로 보고하는 것이다[1].

Hippurate 가수분해 시험은 hippuric acid를 benzoic acid와 glycine으로 가수분해하는 hippuricase (hippurate hydrolase)를 세균이 생성하는 지를 확인하는 시험으로서 benzoic acid를 검출하는 ferric chloride 법과 glycine을 검출하는 ninhydrin 법이 있다[4-6]. Ferric chloride 법은 배양시간이 오래 걸리고 ninhydrin 법에 비해 예민도가 낮으며 검사법이 번거롭고 판독에 어려움이 있기 때문에 대부분의 검사실에서는 ninhydrin 법을 사용한다. Ninhydrin hippurate 가수분해시험은 시험관법과 disk 법이 있으며, 시험관법의 대부분은 B군 연쇄구균을 배양 2시간에 확인할 수 있도록 고안한 Hwang 및 Ederer[10]의 방법을 변형한 것들로서 CDC (Center for Disease and Control) 법, Harvey 법과 Skirrow 법이 있다[4]. CDC 법은 하룻밤 증식후의 집락을 1% sodium hippurate 수용액 0.4 mL에 풀은 다음 37℃ 수조에 2시간 배양하고 0.2 mL의 ninhydrin 용액을 시험관 벽을 따라 서서히 첨가한 다음 수조에서 다시 10분간 배양한 뒤 결과를 확인하는 방법이며, Harvey 법과 Skirrow 법은 CDC 법과 유사하나, Harvey 법은 48시간 배양후의 여러 개의 집락을 37℃ 공기 환경에서 배양하는 것이 다르고, Skirrow 법은 540 nm에서 흡광도 1로 맞춘 균부유액 2 mL를 접종하여 배양한 후

ninhydrin을 첨가한 뒤 37℃에서 2시간 배양한 다음 판독하는 점이 다르다[4]. Disk 법은 집락 1-3개를 0.1 mL의 멸균증류수에 풀은 후 1% sodium hippurate disk를 넣고 수조에서 2시간 배양한 다음 ninhydrin 시약 두 방울을 첨가하여 잘 섞은 다음 30분간 배양한 뒤에 판독하는 방법으로서 Cacho 등[5]은 전통적인 시험관법보다 예민도와 특이도가 높고, 접종량이 적으며 결과 판독에 어려움이 없는 검사임을 보고하였으나, Nicholson 및 Patton[6]은 disk 법도 시험관법과 마찬가지로 접종량 표준화와 결과 판독에 어려움이 있음을 보고하였다. 이처럼 전통적인 hippurate 가수분해 시험은 표준화된 방법이 없다. 이에 본 연구에서는 disk 법의 최적 방법을 찾고자 본 연구를 시행하였는데, 상품화된 hippurate disk의 검사 비용을 줄이기 위하여 자가제조한 디스크를 사용하기로 하였고 이에 따라 1%, 2% 및 4%의 hippurate disk 농도를 만들었으며, 접종 방법과 배양시간 및 ninhydrin 양에 따른 결과 차이를 확인하기 위하여 각 조건을 조합하여 시험에 착수하였다. 또한 각 검사 조건에 따른 예민도와 특이도를 확인하기 위하여 시험 균주가 분리될 때마다 hippuricase 유전자 gene에 대한 PCR 검사를 시행하였다. 또한 본 연구의 hippurate 가수분해 시험은 microplate well을 사용하였으므로 배양조건을 37℃ 공기환경으로 설정하였다. 연구 결과 배양시간이 길고 ninhydrin 및 hippurate의 농도가 높을수록 hippurate 가수분해 양성률이 증가하는 경향을 보였다. 접종 방법은 집락법의 양성률이 탁도법보다 다소 높았으나 4% 집락법에서 음성이었던 5균주 중 3균주는 4% 탁도법에서 2+이상의 양성이었다. 또한 4% 집락법과 4% 탁도법은 hippuricase 유전자 음성인 4균주 중 각각 두 균주에서 1+의 양성을 보였다. 이런 결과로 볼 때 disk 법에서 1+ 결과는 위양성일 가능성이 높음을 알 수 있었다. Hippurate 가수분해 시험은 ninhydrin과 glycine의 반응으로 자주색 화합물 생성을 육안으로 관찰하는 것이므로 빛의 명암과 강도 등에 따라 판독 결과가 달라질 수 있고 시험관내의 peptides, amines 등과의 비특이적인 반응으로 약한 양성 반응이 나타날 수 있다[6].

본 연구 결과를 종합해 볼 때 hippurate 가수분해 검출을 위한 disk 법의 예민도와 특이도를 높이기 위해서는 4% 집락법과 4% 탁도법을 동시에 시행한 후 1+이하는 음성으로 해석하고 두가지 시험 중 하나이상에서 2+이상의 반응을 보이면 양성으로 판정하는 것이 바람직할 것으로 생각되었고, 이와 같은 방법을 적용했을 때의 예민도와 특이도는 91.7%와 100%로서 Cacho 등[5]의 예민도 93%, 특이도 94%와 비슷하였다. 또한 위음성으로 판정되었던 2균주 중 한 균주는 24가지의 disk 법에서 모두 음성이었고 다른 한 균주는 4% 집락법과 4% 탁도법에서는 음성이었으나 다른 방법에서는 2+의 양성을 보였다. 이러한 결과는 hippurate 디스크법의 판독 오류, hippuricase 생성이 적은 균주에 의한 위음성의 가능성과 접종량의 표준화가 어렵고 검사간 변이에 의한 재현성이 낮은

것이 원인으로 생각되었다.

요 약

배 경 : Hippurate hydrolysis 시험은 *Campylobacter jejuni*와 다른 *Campylobacter* 균종을 감별하는데 가장 중요한 검사이다. 이에 저자들은 *C. jejuni*의 hippurate 가수분해를 검출하기 위한 disk 법의 유용성을 평가하였다.

방 법 : 대변 검체로부터 분리된 28균주 *Campylobacter*를 대상으로 hippurate hydrolysis 검출을 위한 disk 법과 hippuricase 유전자에 대한 중합효소연쇄반응 시험을 시행하였다. Disk 법은 배양 시간(2시간과 4시간), hippurate 농도(1%, 2% 및 4%), ninhydrin 량(50 μ L과 100 μ L)과 접종 방법(집락법과 탁도법)을 달리하여 모두 24가지의 hippurate disk 가수분해 시험을 시행하였다.

결 과 : Hippuricase 유전자에 대한 중합효소연쇄반응 시험을 참고법으로 했을 때, 4% 집락법과 4% 탁도법의 두가지 hippurate disk 법을 동시에 시행하면 예민도와 특이도는 91.7%와 100%였다.

결 론 : Hippurate hydrolysis를 검출하기 위한 disk 방법은 사용하기가 간편하며 시험관법보다 접종 균수가 적게 드는 방법으로서 임상검사실에서 통상적인 *C. jejuni*의 신속 동정법으로 사용하기에 유용한 검사법이었다.

참 고 문 헌

1. Nachamkin I. *Campylobacter and Arcobacter*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed., Washington, D.C.: Am Soc Microbiol, 1999:p716-26.
2. 정운섭, 이경원, 김현숙, 이삼열. 최신진단미생물학. 제3개정판. 서울:서홍출판사, 1993:253-9.
3. 신희봉. 1969-1998년의 장염세균분리 추세. 연세대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
4. Morris GK, el Sherbeeney MR, Patton CM, Kodaka H, Lombard GL, Edmonds P, et al. *Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic Campylobacter spp.* J Clin Microbiol 1985;22:714-8.
5. Cacho JB, Aguirre PM, Hernanz A, Velasco AC. *Evaluation of a disk method for detection of hippurate hydrolysis by Campylobacter spp.* J Clin Microbiol 1989;27:359-60.
6. Nicholson MA and Patton CM. *Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by Campylobacter species.* J Clin Microbiol 1995;33:1341-3.
7. Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. *PCR detection, identification to species level, and*

- fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol* 1997;35:2568-72.
8. Ferme C and Engvall EO. *Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, and C. upsaliensis. J Clin Microbiol* 1999;37:3370-3.
 9. van Doorn LJ, Verschuuren-van Haperen A, Burnens A, Huysmans M, Vandamme P, Giesendorf BA, et al. *Rapid identification of thermotolerant Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Campylobacter lari, and Campylobacter upsaliensis from various geographic locations by a GTPase-based PCR-reverse hybridization assay. J Clin Microbiol* 1999;37:1790-6.
 10. Hwang MN and Ederer GM. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1975;1:114-5.