

## 위점막 생검 조직에서 분리된 *Campylobacter pylori*의 성장을 위한 배지 첨가물 및 대기조건

영남대학교 의과대학 임상병리학교실

전창호 · 배은경 · 김경동 · 홍석일 · 김정숙

### 서 론

*Campylobacter pylori*는 (이하 *C. pylori*) 위점막 조직에서 흔히 분리되는 균으로서 최근 위염 및 소화성 궤양과 관련이 깊은 것으로 알려짐<sup>1~3</sup> 이래로 *C. pylori*에 대한 임상적 관심이 높아져서 위점막 생검조직에서 *C. pylori*를 분리 동정하는 방법이 많이 연구 개발중에 있다.<sup>4~5</sup>

생검조직으로부터 *C. pylori*를 배양하는 데는 항생제가 첨가된 chocolate 한천배지를 사용해서 37°C에서 약호기성으로 배양하는 것으로 알려져 있으나,<sup>4~5</sup> 아직 *C. pylori*의 배양 첨가물에 관한 연구가 부족한 실정이다.

이에 저자들은 본원에서 1987년 2월부터 8월까지 임상검체에서 분리동정한 *C. pylori* 균주중 두 균주를 선택하여 여러가지 배지와 두가지 대기조건 하에서 배양하여 몇가지 성적을 얻었다.

### 재료 및 방법

실험 균주로는 영남대학 의과대학 부속 병원에서 위내시경 검사상 위염으로 진단받은 환자의 위점막 생검 조직에서 분리된 *C. pylori* 두 균주를 대상으로 하였다. 균의 동정은 Campy 배지(GC 한천배지에 1%혈색소, 0.2%활성 탄말, 1% IsoVitalex vancomycin 6mg/L, nalidixic acid 20mg/L, amphotercin 2mg/L 첨가)를 사용하여 37°C에서 약호기성 및 과습 상태를 유지하며 3~7일간 배양하여 1mm이하의 반투명 집락이 형성되면 Gram 염색을 실시하여 길이 2~3µm, S자 형태의 굴곡을 나타내고 생화학적 성상을 관찰하여 catalase, urease 및 oxidase 검사에서 양성반응이 나타나면 *C. pylori*로 동정하였다.

분리된 균은 campy배지에 1회 계대 배양시킨후 *C. pylori*의 수송배지로 사용한 20% glucose 용액에 부유시켜 Mc Farland 탁도 0.5에 맞춘 후 준비된 여러 배지에 0.025ml 씩 접종하였다

시험한 배지는 항생제를 첨가한<sup>6,7</sup> GC 한천배지(Oxoid Limited, Hampshire, England), Mueller-Hinton 한천배지(Difco Laboratories, Detroit Mich., U. S. A.) 및 Tryptic soy(Difco) 한천배지 세가지와 이들 배지에 첨가물로 혈색소(동경화성, Tokyo, Japan), 활성 탄말(activated charcoal: Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U. S. A.) 그리고 마혈청(Flow Laboratory, Australasia, Pty. Ltd)을 선택적으로 넣은 배지 등 총 열 여섯가지였다. 시험한 모든 배지에는 Campy배지에 첨가한 세가지 항생제(vancomycin, nalidixic acid, amphotercin)를 Campy배지와 같은 농도로 첨가하였다. 접종 방법은 통상 고형 배지처럼 세방향으로 접종하였다. 한 균주마다 각 종류의 배지 두개씩 접종하여 한개는 혐기성 단지에 넣어 Catalyst없이, 혐기성 가스발생 봉지만(Becton Dickson and Co. Cockeysville,.) 넣어 약호기성으로 배양하고 나머지는 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. *C. pylori*는 85% 정도의 질소를 필요로 하기 때문에 혐기성 단지에는 증류수에 적신 멸균 거즈를 넣고 이산화탄소 배양기에는 증류수를 채운 pan을 밑바닥에 놓아 배양하였다. 이와 같은 조건에서 배양후 3일부터 배지상의 성장정도를 관찰하였으며 동일 조건에서 3회 내지 5회 반복 배양하였다

성장정도의 평가는 접종줄을 통한 성장범위에 따라 1+에서 4+까지 등급을 정하여 관찰하였다 (Table 1.)<sup>8</sup>.

**Table 1.** Assessment of growth of *Campylobacter pylori*

Extent of growth in the initial plate	Scale
Slight growth in the initial half of the plate.	1+
Moderate growth in the half plate	2+
Growth into the third quadrant.	3+
Growth into the fourth quadrant.	4+

성 적

여러 고형 배지에 접종한 *C. pylori* 의 약호기성에서의 성장결과는 Table 2와 같다.

시험한 GC 한천배지, Mueller-Hinton 한천배지 및 Tryptic soy 한천배지에서 모두 침가물이 없는 경우는 *C. pylori* 가 자라지 않았으며 1% 혈색소나 마혈청을 첨가한 배지에선 모두 집락을 형성하였으나 0.2% 활성 탄말만 첨가한 배지에서는 배양 7

**Table 2** Growth of *Campylobacter pylori* isolates on various agar media under microaerophilic condition

Medium	Relative growth			
	Strain 1		Strain 2	
	Day4	Day6	Day 4	Day6
Campy* media	4+	4+	4+	4+
GC agar base	—	—	—	—
Mueller-Hinton agar	—	—	—	—
Tryptic Soy agar	—	—	—	—
GC agar + 1% hemoglobin	3+	4+	4+	4+
GC agar + 1% horse serum	2+	2+	3+	3+
GC agar + 0.2% charcoal	—	—	—	—
GC agar + 1% hemoglobin + 0.2 charcoal	4+	4+	4+	4+
GC agar + 1% horse serum + 0.2 charcoal	3+	3+	3+	4+
MH** agar + 1% hemoglobin	3+	3+	3+	4+
MH agar + 1% horse serum	1+	3+	2+	2+
MH agar + 5% horse serum	3+	4+	3+	3+
MH agar + 0.2% charcoal	—	—	—	—
MH agar + 1% hemoglobin + 0.2% charcoal	3+	3+	4+	4+
TSA*** + 1% hemoglobin	3+	3+	3+	3+
TSA + 1% horse serum	1+	2+	1+	1+
TSA + 0.2% charcoal	—	—	—	—

\*: Composed of GC agar base, 0.2% charcoal, 1% hemoglobin and 1% IsoVitalEX

\*\* : Mueller-Hinton agar

\*\*\* : Tryptic Soy agar

일찌까지 모두 자라지 않았다

단일 첨가물 사용시 1% 혈색소를 사용하였을 때 가장 좋은 성장 상태를 나타내었다 그러나 마혈청이나 혈색소 한가지만 첨가했을 때 보다 활성 탄말을 함께 첨가한 경우 성장결과가 가장 좋았다

Mueller-Hinton 한천배지 사용시에는 마혈청은 1%보다 5%를 첨가하였을 때 집락 형성이 더 양호하였다. Tryptic soy 한천배지는 GC 한천배지나

Mueller-Hinton 한천배지를 기본 배지로 사용한 경우보다 성장상태가 좋지 못하였다.

Table 3은 이산화탄소 배양기에서 각각의 고형 배지에 대한 *C. pylori* 의 성장상태를 나타내었다.

역시 세가지 배지 모두 첨가물 없이는 자라지 않았으며 0.2% 활성탄말만 사용한 경우에도 성장하지 못하였다 Tryptic soy 한천배지에선 1% 혈색소나 1% 마혈청만 첨가한 경우에는 집락형성이 이루어

**Table 3.** Growth of *Campylobacter pylori* isolates on various agar media in the CO<sub>2</sub> incubator

Medium	Relative growth			
	Strain 1		Strain 2	
	Day 4	Day 6	Day 4	Day 6
Campy media	3+	4+	4+	4+
GC agar base	—	—	—	—
Mueller-Hinton agar	—	—	—	—
Tryptic soy agar	—	—	—	—
GC agar+1% hemoglobin	3+	3+	3+	4+
GC agar+1% horse serum	—	1	1+	2+
GC agar+0.2% charcoal	—	—	—	—
GC agar+1% hemoglobin + 0.2% charcoal	3+	4+	4+	4+
GC agar+1% horse serum+0.2% charcoal	2+	2+	2+	3+
MH agar +1% hemoglobin	3+	3+	4+	4+
MH agar +1% horse serum	1+	1+	1+	2+
MH agar +5% horse serum	2+	3+	3+	3+
MH agar +0.2% charcoal	—	—	—	—
MH agar+1% hemoglobin+0.2% charcoal	3+	3+	4+	4+
TSA +1% hemoglobin	—	—	—	—
TSA +1% horse serum	—	—	—	—
TSA +0.2% charcoal	—	—	—	—

지지 않았다.

이산화탄소 배양기에서 증균시켰을 때는 형성된 집락의 크기가 작고 성장범위도 약호기성의 조건보다 좁게 나타났다

### 고 안

본교실에서는 1987년 2월부터 8월까지 내시경검사를 실시한 227명의 환자를 대상으로 위생검 조직검사와 Gram염색 및 증균배양을 실시하여 만성위염환자 192명중 148명에서, 위궤양 환자 24명중 14명에서, 정상인 8명중 1명에서 각각 *C. pylori*가 분리되었음을 보고한 바 있다<sup>9</sup>

*C. pylori*는 1983년 Marshall과 Warren<sup>10</sup>등에 의하여 위점막에서 처음으로 발견되었으며 그 후 위염의 원인균으로 작용하여 위궤양을 일으키는 것으로 간주되었다<sup>11,12</sup>

이 균은 Gram염색상에서 특징적인 만곡형 혹은 S자형의 Gram음성 간균으로서 다른 *Campylobacter* species와는 달리 다수의 극성편모를 지니며<sup>13</sup> 지방산 및 단백질 구성성분도 상이하다<sup>14</sup> 1987년 Romanuk 등은 *C. pylori*의 16s - FNA 구조

를 조사하여 *Campylobacter*와는 다른 종으로 분류하였다.<sup>15</sup>

약호기성 대기에서 chocolate 한천배지에서의 배양성상은 1mm이하 직경의 작은 반투명 집락을 형성하고 생화학적 성상으로 oxidase, catalase, urease, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl aminopeptidase 및 DNase 양성반응을 나타낸다.<sup>16,17</sup>

*C. pylori*는 위점막과 위 상피세포의 세포간 결합부위에서 군집화를 이루는데 위점막에서는 urea가 고농도로 존재하는 세포간 결합부위로 나선운동을 통해 이동하며 위 상피세포간 결합부위에서는 혈액색소를 쉽게 이용할 수 있어 *C. pylori*의 성장을 용이하게 한다.<sup>18</sup>

따라서 *C. pylori*는 보통 혈액이나 혈청을 첨가한 배지에서 37°C 약호기성 조건하에서 가장 잘 자란다고 한다.<sup>9,17</sup> 그러나 GC 한천배지에서는 첨가물 없이도 집락을 형성하였으며 반면 Nutrient 한천배지에서는 혈액이나 혈청을 첨가해도 자라지 않는 보고들이 있다.<sup>9</sup> 이와같이 기본배지에 따라 *C. pylori* 성장이 변화하는 이유로 Buck<sup>19</sup> 등은 *C. pylori*의 성장에는 혈청, 진분, 황성 탄말 등이 요구되며 이 첨가물의 역할은 배지에 존재하는 독성인자를

흡수하거나 비활성화하는 것이라고 추측하였다. 따라서 배지성분중 전분이 포함되어 있는 GC 한천 배지나 Mueller-Hinton 한천 배지에서는 첨가물 없이도 성장을 나타내었다고 한다.

그러나 저자들의 결과에서는 첨가물 없는 GC 한천배지나 Mueller-Hinton 한천배지에서 집락이 형성되지 않아 이전 보고와 상반된 결과를 보여준다. Buck<sup>9)</sup> 등은 접종하기 위한 균부유액을 제작하는 과정에서 전분과 마혈청 등이 함유된 bruceila 액체배지에 증균 배양후 고형배지에 접종하여 20% 포도당 용액에 부유시킨 저자들의 방법과 서로 차이가 나기 때문이라고 추측되지만 Buck 등의 결과 역시 첨가물 없는 성장상태가 만족스럽지 못하므로 *C. pylori*의 배양에 첨가물이 요구되는 것이 분명하다.

활성 탄말은 영양적인 가치는 없으나 배지에 존재하는 독성물질을 흡수하므로써 *C. pylori*의 성장을 촉진시키며 활성탄말이나 전분인 GC 한천 배지나 bruceila 한천 배지에 첨가하여도 균집락형성이 이루어진다고 하였으나 저자들의 결과에 의하면 0.2% 활성 탄말만 첨가한 경우엔 배지에 상관없이 집락형성이 이루어지지 않았다.

하지만 혈색소나 마혈청만을 첨가한 배지보다 활성 탄말을 추가한 배지에서 집락형성이 양호한 것으로 보아 활성 탄말이 *C. pylori*의 성장을 촉진시키는 인자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 전분이 결핍되어있는 Tryptic soy 한천배지는 혈색소나 마혈청을 추가하여도 동일한 첨가물을 사용한 GC 한천 배지나 Mueller-Hinton 배지에 비하여 집락형성이 양호하지 못하였다.

단일 첨가제만 사용한다고 가정할 때 항생제를 첨가한 배지에 1%혈색소만을 첨가한 경우 Campy 배지와 유사한 집락형성 상태를 보였으며 이는 chocolate 배지에 잘 성장하는 *C. pylori*의 특성과 일치한다.<sup>12,16)</sup> 이산화탄소 배양기에서 증균 배양을 실시한 경우 약호기성으로 배양한 예보다 전반적으로 형성된 균집락의 크기가 작고 성장 범위도 좁게 나타났다. Goodwin<sup>9)</sup> 등은 위점막 조직에서 *C. pylori*를 분리하기 위해 혐기성 단지를 이용한 배기 대체법(5% 산소, 7% 이산화탄소, 8% 수소, 80% 질소), Campylobacter 가스 혼합물(8% 이산화탄소, 7% 산소, 85% 질소) 및 이산화탄소 배양기(7% 이산화탄소, 20% 산소, 73% 질소)의 세 가지 대기조건에서 배양한 결과 이산화탄소에서 증균 배양한 것이 다른 두 종류의 대기 조건보다 성장상태가 양호하지 못하여 저자들과 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 GC 한천 배지나 Mueller-Hinton 배지에 활성 탄말

과 혈색소를 함께 첨가한 배지에서 집락 크기 및 성장 상태가 양호하므로 혐기성 단지를 사용하지 않는 병원에서도 *C. pylori*의 분리 농성우 용이하게 할 수 있을 것이다.

이상을 종합하면 *C. pylori*의 증균 배양에 이상적인 배지와 대기조건은 vancomycin, nalidixic acid, amphotercin의 3가지 항생제와 1% 혈색소 및 0.2% 활성 탄말을 추가한 GC 한천배지를 37°C 약호기성의 과습 대기상태로 배양하는 것이라 사료된다.

## 요 약

저자들은 *C. pylori*의 분리를 위한 이상적인 배지 첨가제를 결정하기 위하여 위염환자의 위점막 생검 조직에서 분리 동정한 *C. pylori* 두 균주를 vancomycin 6mg/L, nalidixic acid 20mg/L 및 amphotercin 2mg/L를 함유한 GC 한천 배지, Mueller-Hinton 한천 배지 및 Tryptic soy 한천 배지에 1% 혈색소, 1% 마혈청 및 0.2% 활성 탄말을 조합하여 첨가한 배지들에 접종하여 과습상태의 약호기성 대기와 이산화탄소 배양기에서 각각 배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Tryptic soy 한천 배지는 GC 한천 배지나 Mueller-Hinton 한천 배지보다 *C. pylori*의 증균 배양에 적합하지 못하였다.

GC 한천 배지에 혈색소만 첨가하여도 Campy 배지와 유사한 성장결과를 얻을 수 있었다.

이산화탄소 배양기는 약호기성 대기 상태보다 *C. pylori*의 증균 배양에 적합하지 못하지만 GC 한천 배지에 혈색소와 활성탄말을 함께 첨가하면 혐기성 단지가 없는 검사실에서도 *C. pylori*를 배양할 수 있다.

*C. pylori*의 증균 배양에 이상적인 배지로는 항생제와 혈색소 및 활성탄말을 함유한 GC 한천 배지이며 배양의 대기 조건은 37°C 과습 상태의 약호기성 대기상태라고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Marshall, B. J., and Warren, J. R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 6 (16) : 1311~1314, 1984.
2. Booth, L., Holdstock, G., MacBride, H., H awtin, P., Gibson, J. R., Ireland, A., Bamf-

- orth, J., DuBoulay, C. E., Lloyd RS, and Pearson, A. D., : Clinical importance of *Campylobacter pyloridis* and associated serum IgG and IgA antibody responses in patients undergoing upper gastrointestinal - endoscopy. *J. Clin Pathol.*, 39 (2) : 215~219, 1986.
3. Buck, G. E., Gourley, W. K., Lee, W. K., Subramanyam, K., Latimer, J. M., and DiNuzzo, A. R. : Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. *J. Infect. Dis.*, 153 (4) : 664~669, 1986.
4. Jones, D. M., Lessells, A. M., and Eldridge, J. : *Campylobacter* - like organism on the gastric mucosa: Culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.*, 37 : 1002~1006, 1984.
5. Goodwin, C. S., Blincow, E. D., Warren, J. R., Waters, T. E., Sanderson, C. R., and Eaton, L. : Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.*, 38 : 1127~1131, 1985.
6. Buck, G. E., and Smith, J. S. : Medium supplementation of *Campylobacter pyloridis*. *J. Clin. Microbiol.*, 25(4) : 597~599, 1987.
7. McNulty, C. A., Dent, J., and Wise, R. : Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pyloridis* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 28 (6) : 837~838, 1985.
8. Finegold, S. M., and Baron, E. J. : *Diagnostic Microbiology*. 7th ed., St Louis Toronto Princeton. C. V. Mosby Co., 1986, p. 101.
9. 홍석일, 이채훈, 김정숙 : 위염 환자의 내시경 위 생검 조직에서 *Campylobacter pyloridis*의 분리, 대한 임상병리 추계 학술대회 초록집, 대한 임상병리 학회, 1987. p. 16.
10. Drumm, B., Sherman, P., Cutz, E., and Karmali, M. : Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral, gastritis in children. *N. Eng. J. Med.*, 316 (15) : 1557~1561, 1987.
11. Siragusa, J. J. : Peptic ulcer disease, a bacterial infection?. *N. Engl. J. Med.*, 316 (25) : 1598~1600, 1987.
12. Taylor, D. E., Hargreaves, J. A., NG, LK., S herbanuk, R. W. and Jewell, LD : Isolation and characterization of *Campylobacter pyloridis* from gastric biopsies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 87 (1) : 49~54, 1987.
13. Pearson AD, Bamforth J. Booth L. Holestock, G., Ireland. A., Walker, C., Hatwin, P., and Millward - Sadler, H. : Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. *Lancet*, June (16) : 1349~1350, 1984.
14. Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trust, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R., and Stahl, D. A. : *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp., *J. Bacteriol.*, 169 (5) : 2137~2141, 1987.
15. McNulty, C. A., and Dent, J. C. : Rapid identification of *Campylobacter pylori* by preformed enzymes. *J. Clin. Microbiol.*, 25 (9) : 1683~1686, 1987.
16. Hazell, S. L., Lee, A., Brady, L., and Hennesy, W. : Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.*, 153 (4) : 658~663, 1986.

## Medium Supplementation and Atmospheric Condition for Growth of *Campylobacter pylori* isolated from gastric biopsy tissue.

Chang Ho Jeon, Eun Kyung Bae,  
Kyung Dong Kim, Seok IL Hong, and Chung Sook Kim

*Department of Clinical Pathology,  
College of Medicine, Yeungnam University,  
Taegu, Korea.*

Experiments were conducted to define the optimal constituents of culture medium and atmospheric condition for growth of *Campylobacter pylori*. Two clinical isolates were streaked onto various media, incubated in two different atmospheric conditions (microaerophilic condition and carbon dioxide incubator), and growth was assessed semiquantitatively according to relative colony size and extent of growth through the streak. The growth obtained on Campy media, composed of GC agar base plus 1% hemoglobin, 0.2% activated charcoal, 1% IsoVitaleX, vancomycin 6mg /L nalidixic acid 20mg /L and amphotericin 2mg /L, was used as reference. Our conclusions were as follows :

Tryptic soy agar base was not acceptable for the growth of *C. pylori*.

As a sole supplementation, GC agar containing 1% hemoglobin was relatively adequate for the growth of *C. pylori*.

The organism grew in both atmospheric conditions, but generally showed a scantier growth in the carbon dioxide incubator than under the microaerophilic condition, however GC agar containing 1% hemoglobin and 0.2% activated charcoal supported well the growth of *C. pylori* in the carbon dioxide incubator.

The authors have found that the GC agar base supplemented with 1% hemoglobin and 0.2% charcoal was the most satisfactory medium and a microaerophilic condition was optimal atmospheric condition for the growth of *Campylobacter pylori* in this study.