

## 질 트리코모나스의 분리에 선택적인 배지의 조성

조선대학교 의과대학 미생물학교실, 그린 산부인과병원\*

양남웅 · 임 용 · 신성희 · 박종훈 · 이강길 · 나윤정\* · 장하중\*

### The Composition of a Selective Media for *Trichomonas vaginalis* Isolation

Nam-Woong Yang, M.D., Yong Lim, M.D., Sung-Heui Shin, M.D., Jong-Hun Park, M.D.

Kang-Kil Lee, M.D., Yun-Jung Ra, M.D.\* and Ha-Jong Jang, M.D.\*

Department of Microbiology, Chosun University School of Medicine, Green Hospital\*, Kwangju, Korea

**Background :** Modified Diamond medium (MDM) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, streptomycin, penicillin G, and mycostatin is commonly used for the isolation of *Trichomonas vaginalis* from vaginal swab. But, judging from our experience, the above usual MDM antibiotic composition was frequently contaminated with facultative anaerobes, and isolation rate of *T. vaginalis* was no more than 12% in 142 Korean woman patients whose chief complaints were foul odored, increased vaginal discharge. This isolation rate is low in comparison with reports of other countries including U.S.A (about 15~30%) and could be attributed to the prevalence of antibiotic resistance in Korea. So, we exploited more selective antibiotic compositions in modified Diamond medium for pure isolation of *T. vaginalis*.

**Methods :** we used new self-devised anaerobic pack for sample maintenance and tested several antibacterial and antifungal agent combinations in modified Diamond medium supplemented with 5% human erythrocyte lysate and 5% heat-inactivated human serum in the place of 10% horse serum with the object of increased and pure isolation of *T. vaginalis*. Several drugs and chemicals were tested to fourteen wild strains isolated in a local clinic, in the hope of finding the agents that have no effect on *T. vaginalis* growth in high drug concentrations. Anaerobic jar was used for culture of *T. vaginalis* and cell count performed in the improved Neubauer's haemocytometer.

**Results :** Strains of *T. vaginalis* grew better in modified Diamond medium supplemented with 5% human erythrocyte lysate and 5% heat-inactivated human serum

(mean  $1.166 \times 10^6$ , about 5.83 fold) than 10% horse serum (mean  $2.0 \times 10^5$  after 48 hours culture), and their growth rate in the former was more rapid than the latter in early growth phase. On the basis of this results, we examined selectivity of modified Diamond media supplemented with several antibacterial and antifungal combinations by a double blind test. Isolation rate in the conventional modified Diamond's medium (combination A; 10% horse serum, streptomycin 1,200  $\mu\text{g/mL}$ , penicillin G 1,500 unit/mL, mycostatin 37.5  $\mu\text{g/mL}$ , pH 6.2) was 9/73 (12.3%) while in modified Diamond medium supplemented with 5% human erythrocyte lysate and 5% heat-inactivated human serum, isolation rates in various drug combinations were as follows; Combination B (cefazolin 100  $\mu\text{g/mL}$ , streptomycin 1,200  $\mu\text{g/mL}$ , clindamycin 150  $\mu\text{g/mL}$ , pH 6.5), combination C (bacitracin 14.6 unit/mL, streptomycin 1,200  $\mu\text{g/mL}$ , clindamycin 150  $\mu\text{g/mL}$ , pH 6.5) and combination D (vancomycin 100  $\mu\text{g/mL}$ , streptomycin 1,200  $\mu\text{g/mL}$ , clindamycin 150  $\mu\text{g/mL}$ , pH 6.5) were all 11/73 (15.0%). Combination D allowed the least bacterial growth rate.

**Conclusion :** We consider that a new modified Diamond medium supplemented with 5% human erythrocyte lysate, 5% heat-inactivated human serum and combination D might be provide the highest selection for *Trichomonas vaginalis* pure isolation from vaginal swabs. (Korean J Infect Dis 32:33~40, 2000)

**Key Words :** *Trichomonas vaginalis*, Selective medium

\* 본 연구는 1996년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

접수 : 2000년 1월 10일, 승인 : 2000년 2월 14일

교신저자 : 양남웅, 조선대학교 의과대학 미생물학교실

Tel : 062)220-3662, Fax : 062)232-3125, E-mail : nwyang@mail.chosun.ac.kr

## 서론

질 트리코모나스는 세계적으로 가장 흔한 비바이러스성 성인성 질환으로써<sup>1)</sup>, 최근에는 선진국에서는 그 발생률이 감소하고 있는 추세이나 아프리카 등 후진국에서는 여전히 높은 이환률을 보이고 있다. 또한 metronidazole에 대한 내성 충주가 증가하여 치료가 복잡해지고 있는 양상을 띠고 있다<sup>2)</sup>.

질 트리코모나스에 대한 관심은 80년대 이후 높아지기 시작하여 병인론적 연구, 새로운 진단법의 개발, 역학적인 조사, 새로운 치료제의 개발, 개선된 배양방법의 고안, 내성 충주의 출현에 대한 많은 보고서들이 발표되고 있다. 그러나 이 원충에 관한 국내의 연구자들의 관심은 미미하며 특히 임상가들의 관심 밖으로 밀려나 있는 형편이다. 대부분의 개원가에서는 질 트리코모나스의 진단을 육안적인 진찰소견이나 민감도가 떨어지는 생리 식염수 도말법을 사용하는 정도에 머무르고 있으며, 질 트리코모나스에 선택적인 약제인 nitroimidazole 계열의 약제들을 경험적으로 남용하고 있는 실정이다. 그 결과 nitroimidazole계 약제들에 내성인 충주들이 많이 생겨났을 것으로 추정된다. 또한 임상 의사들은 국내의 감염 실태에 따른 유익한 정보나 진단과 치료에 도움이 될만한 자료를 얻지 못하고 있으며 관심 또한 많지 않은 경향을 보인다. 국내에서는 이환률에 대한 규모있는 역학 조사가 이루어져 있지 않고, 연구자들 또한 많지 않다. 질 트리코모나스는 여러 가지 주산기 합병증들, 비뇨 생식기 감염, HIV의 전파의 증가와 관계가 있다고 보고되어 있다. 즉, 질 내의 세균 생태학적인 환경에 변화를 초래하여 저 체중아, 조기분만, 조기 양막파수와 세균성 질증과 같은 산부인과 질환들의 중요한 유인들의 하나로써 새롭게 주목되고 있다<sup>3-8)</sup>. 동시에 바이러스와 병원성 세균들의 전파 매개체의 역할도 한다는 점에서 관심이 되고 있다<sup>1, 2, 9-11)</sup>. Metronidazole에 내성을 가진 충주가 출현되어 확산되고 있다는 보고들은 이 질환에 효과적인 약제들이 현재로서는 5-nitroimidazole 계열의 약제들뿐이라는 점에서 심각성이 있다<sup>12)</sup>. 우리나라는 외국에 비하여 항균제를 남용하는 경향이 있다. 본 연구자는 국내의 항균제 사용 실태를 고려하여, 질 증상을 주소로 내원한 환자들을 대상으로 질 트리코모나스의 이환율을 조사하고, 질 트리코모나스의 분리 배양에 현재 가장 많이 사용되고 있는 modified Diamond medium의 원충 분리율을 한층 높일 수 있는 배지의 조성을 찾고 그 결과를 토대로 향후 선택배지의 선택성과 배양진단의 민감도가 100%인 배지를 개발하는 것을 목

표로 이 실험을 시도하여 약간의 유의있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 원충의 검출 및 분리 배양

광주 시내에 소재한 산부인과 병원에 질 분비물의 증가나 동통 또는 소양감을 주소로 내원한 외래 환자들에서 면봉으로 채취한 가검물들을 modified Diamond's medium<sup>13-15)</sup> (tryptose or trypticase 20 g, yeast extract 10 g, maltose 5 g, ascorbic acid 200 mg, L-cysteine · HCl · H<sub>2</sub>O 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhydrous 800 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 800 mg, Distilled water 900 mL, pH 6.2; 필요한 양만큼 분주하여 고압숙열 멸균후, 배지를 식힌 다음, 56℃ 30분 열처리하여 여과 멸균한 마혈청을 10%되게 부가하고 배지 1 mL당 penicillin G 1,500 unit, streptomycin 1,200 µg, mycostatin 37.5 µg 첨가)을 1 mL씩 분주한 미세 원침 튜브에 접종한 다음 이를 Figure 1과 같이 자체 제작한 혐기 상태 유지용 50 cc cornical tube에 넣어 증류수 3 cc를 첨가하여 혐기상태로 만든 다음, 35℃ 배양기에서 유지하다가(50 cc cornical tube transport method), 오후에 실험실로 옮겨 Figure 2와 같은 V자 관에 재 접종하였다. 참고로 자체 제작한 혐기 상태 유지용 용기에 들어간 성분은 다음과 같다. Sodium borohydride 35 mg을 튜브의 맨 아래쪽에 넣고, 그 위에 탈지면을 적당량 덮었



Figure 1. A photograph of the anaerobic pack devised for the transfer of *T. vaginalis*.



**Figure 2.** A photograph of V-shaped culture tube for pure isolation of *T. vaginalis*.

다. 탈지면 위에 각 1분자량씩 섞은 sodium bicarbonate plus citric acid ( $\text{CO}_2$  발생용)를 80 mg을 넣은 다음, 다시 적당량의 탈지면을 넣었다. 촉매에서 발산되는 열로부터 보호하기 위하여, 뚜껑의 안쪽에 양면테이프를 3겹으로 잘라 붙이고 백금 코팅 촉매 알갱이 1개를 부착하였다. 이어서 증류수 3 cc를 붓고 즉시 마개를 밀폐하여 혐기 상태를 유도하였다 (Figure 1). 원충의 wet smear를 위하여 pH 7.2 인산 완충 식염수를 0.9 cc 넣은 미세 원침 튜브에 역시 먼봉으로 취한 질 분비물을 혼합하여 운반 용기에 상기와 같이 함께 넣어 오후에 실험실에서 검경하여 운동성이 있는 원충과 yeast의 유무를 확인하였다.

## 2. 질 트리코모나스의 순수 배양

질 분비물내의 혐기성 세균들로부터 질 트리코모나스를 순수 분리 배양하기 위하여 자체적으로 만든 V자 관(Figure 2)에 항균제를 함유한 modified Diamond 배지를 분주한 다음, 혐기 상태로 유지된 분비물 부유액 0.5 mL를 미세 피펫으로 취하여 일측에 재 접종하고, anaerobic jar (BBL GASPAC SAK™ Anaerobic system, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, U.S.A.)에 안치하여 2~3일간 35℃에서 혐기 배양하였다. 배양이 끝난 후, 접종하지 않은 다른 한쪽에서 미세 피펫으로 소량의 배양액을 취하여 슬라이드 글라스에 놓고 커버글라스를 덮은 후, 400×로 움직이는 원충의 유무를 확인하였다. 운동성이 있는 원충이 확인되면, 무균 배양을 더 확실하게 하기 위하여 새 배지 5 mL이 들어있는 screw cap tube에서 2회 계대 배양하였다. 무균 배양이 이루어지지 않은 경우에는 상기 과정을 재 반복하였다.

## 3. 질 트리코모나스의 보관

상기와 같이 무균 배양된 질 트리코모나스 총주는 탁상형 원심분리기에서 4,000 rpm으로 원침하여 상청액을 제거하고

생리 식염수로 2회 원침 세척한 후, 10% dimethyl sulfoxide, 10% horse serum을 함유한 증류수에 원충액이 15%가 되게 부유하고 이를 냉동 보관용 튜브(NALGENE CRYOWARE, Nalge Company, Rochester, NY, U.S.A.)에 0.5 mL씩 분주하여 4℃에서 4시간, 20℃에서 1시간, 70℃에서 1시간 냉동한 후 액체 질소 탱크에 넣어 장기 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

## 4. 각종 항생제 및 항진균제가 질 트리코모나스의 성장에 미치는 영향

상기와 같이 분리하여 보관한 질 트리코모나스 14개 원충주의 성장에 영향을 주지 않는 항생제 및 항진균제를 찾기 위하여 Meingassner의 multiwell plate 법<sup>16)</sup>을 약간 수정하여 다음과 같이 시행하였다<sup>25)</sup>. 각 약제의 stock solution (8 mg/mL or 4 mg/mL)을 제조한 다음, 소형 원침튜브(1.2 mL 용량)에 1번 튜브의 경우 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 이어 나머지 튜브에는 50  $\mu\text{L}$ 씩 2배 계단 희석하였다. 48시간 배양한 원충액을 혈구 계산판을 이용하여 50,000 cells/mL이 되게 새로운 액체배지로 희석한 후, 희석 원충액 0.75 mL씩을 부과한다. 따라서 약제 희석액과 희석 원충액의 합은 0.8 mL이 되며, 1번 튜브의 경우 약제의 양은 500  $\mu\text{g/mL}$  혹은 250  $\mu\text{g/mL}$ 이 된다. 48시간 혐기 배양 후에 소형 원침 튜브를 소형 원심분리기(Micro Centaur MSE U.K.)에서 6,500 rpm으로 5분간 원침한 다음, 상청액 0.7 mL을 제거하고 남은 0.1 mL을 부유시켜 10  $\mu\text{L}$ 를 취한다. 이를 슬라이드 글라스 위에 놓고 커버글라스를 덮은 다음, 400× 시야 전체를 살펴서 형태와 운동성이 완전한 원충의 유무를 통하여 최소 치사농도(minimal lethal concentration, MLC)로 정하였다. 100× 시야 10개에서 2마리 이하(약 12.8 마리/mL 정도)의 원충이 생존한 경우는 최소 성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)로 정하였다. 사용된 약제와 희석제는 다음과 같다(제조 회사, 희석제): bacitracin sulfate (Sigma, D.W), clindamycin phosphate (Sigma, D.W), pefloxacin (Sigma, D.W), cefazolin (Sigma, D.W), vancomycin HCl (제일제당, normal saline), sodium azide (Sigma, D.W), sodium benzoate (Sigma, D.W), sodium thioglycolate (Sigma, D.W), methylene blue (Sigma, D.W).

약제의 원액은 필요시에는 새로 제조하였고 일회용 여과기로 여과 멸균하여 사용하였다.

## 5. Modified Diamond medium에 5% 사람 적혈구 용해액과 5% 열 불활성화 사람 혈청 첨가시 성장 촉진 효과

사람 혈액에서 혈장을 제거하고 남은 적혈구를 생리 식염

수로 3회 원침 세척한 다음, 생리 식염수를 넣어 hematocrit 가 45% 되게 하고 나서, 이를 영하 50℃에서 냉동, 실온에서 해동을 5회 반복하여 적혈구 용해액을 만들었다. 사람 혈청은 원침 세척한 *T. vaginalis*와 35℃에서 5시간 반응시켜, 원충의 주변이 깨끗하고 운동성이 완전하며 응집이 일어나지 않은 것을 확인한 다음, 이 혈청을 56℃에서 30분간 열처리 하여 보체를 불활성화 시킨 후, modified Diamond medium에 5% 되게 넣고 적혈구 용해액도 5% 되게 첨가하고 pH를 6.2가 되게 조정하였다. G-1부터 G-14까지 14 층주를 혈구 계산판을 사용하여 5,000 cells/mL이 되도록 modified Diamond medium supplemented with 5% human erythrocyte lysate & 5% heat-inactivated human serum 배지에 희석, 접종하고 10% 마혈청 modified Diamond medium에도 동일하게 희석 접종하여 대조로 삼았다. 48시간 혐기 배양한 후, 각 층주의 최종 층수를 계산하고 평균을 내었다. 그 결과를 바탕으로 가장 많이 성장한 G-7, 가장 적게 성장한 G-10, 그리고 14 층주의 평균에 가깝게 성장한 G-4를 선택하여 상기 두 배지에서의 성장 곡선을 그렸다. 배양은 anaerobic jar에서 시행하였으며, 6시간마다 일정량을 취하여 improved Neubauer's haemocytometer를 사용하여 원충수를 계산하였다. 샘플을 취한 후, anaerobic jar의 혐기 상태를 즉시 회복할 수 있도록 Figure 1과 같은 방식으로 혐기통의 용량에 맞게 미리 만들어둔 일회용 cornical tube pack (sodium borohydride 800 mg, sodium bicarbonate plus citric acid 2.9 g)을 사용하였다. 혐기통내 혐기 상태의 회복을 관찰하기 위하여 anaerobic strip (BBL)을 사용하였다.

#### 6. Modified Diamond medium의 첨가물 차이에 따른 질 트리코모나스 원충의 분리 배양성적, 세균 및 효모 증식의 차이

상기 실험을 근거로 하여 항균제의 조합을 선택하고 5% 사람적혈구 용해액, 5% 열처리 사람 혈청을 첨가한 선택 배지들과 기존의 modified Diamond medium에서 질 트리코모나스의 분리율을 비교하기 위하여 광주광역시 소재 산부인과 병원에 질 증상을 주소로 내원한 환자 73명을 대상으로 원충의 분리를 시도하였다. 실험에는 처음 층주 분리 시와 마찬가지로 50 cc cornical tube transport method를 사용하였다. 실험실로 이송한 샘플들은 즉시, 오전에 미리 제조하여 냉장 보관 중인 배지(각 조합 배지 4 mL이 들어 있는 screw cap tube)들에 재 접종하고 50 cc cornical tube로 만든 anaerobic pack과 함께 anaerobic jar에 넣고 35℃에서 3일 이상 배양한 다음, 일정량을 취하여 유리 슬라이드 위에서 400×로 최대한 전체 시야를 검정하여 운동성이 있는 원충의 유무를 확인

하였으며 동시에 세균 및 효모의 존재도 검정하였다. 실험에 사용한 약제와 배지의 조합은 Table 4와 같다. 약제의 조합은 Antibiotics in Laboratory Medicine<sup>17)</sup> 책자를 참고하여 선정하였으며, streptomycin은 질 트리코모나스 원충의 성장에 최적 pH인 6.2~6.5에서 MIC가 16배 정도 낮아지기 때문에 전체 조합들에 공통으로 사용하였다.

### 결 과

#### 1. Wet smear와 Modified Diamond Medium에서 원충의 검출 및 배양 성적

자체 고안한 50 cc cornical tube transport method를 사용하여 실험실로 운반한 샘플들에서 wet smear를 시행하고 modified Diamond's medium에서 배양한 결과 총 142 샘플 중에서 현미경적으로 검출한 경우는 18 cases (12.67%)였으며, 배양이 양성인 경우는 17 cases (12%)였다. 또한 wet smear에서 세균성 질증의 유력한 증거인 clue cell이 검출된 경우는 133샘플 중에서 37 cases (27.8%)였으며, Yeast가 보인 경우는 83샘플 중에서 8 cases (9.6%)였다(Table 1).

#### 2. 각종 항균제 및 항진균제가 질 트리코모나스 성장에 미치는 영향

Modified Diamond medium에 첨가할 항균제 및 항진균제의 적절한 조합을 찾기 위하여 여러 약제에 의한 최소 억제 농도를 질 트리코모나스 14 층주에 대하여 알아보았다. Methylene blue는 액체배지의 혐기 상태를 나타내는 데 사용하는 양이 통상 2.0 µg/mL이며 원충의 성장을 억제하는 최소 농도(MIC)는 7.8 µg/mL이었다. 그러나 배지에 함께 사용하는 sodium thioglycolate의 MIC는 Brewer's modified thioglycolate medium에 첨가하는 양과 동일하기 때문에, anaerobic jar를 사용하지 않고 혐기적으로 원충을 배양하기 위한 목적에는 두 약제가 적합하지 않은 것으로 판정하였다. 항진균 효과를 위하여 실험한 sodium benzoate와 sodium azide

Table 1. Detection Rate of *Trichomonas vaginalis*, Clue Cell, and Yeast

	No. (%) of positive wet smear	No. (%) of positive culture in modified Diamond medium
<i>T. vaginalis</i>	18/142 (12.67)	17/142 (12)
Clue cell	37/133 (27.8)	ND
Yeast	8/83 (9.6)	ND

ND, not done

역시 통상 사용량보다 낮은 농도에서 MIC를 보였기 때문에 사용하기 부적합한 것으로 판정하였다. 여성의 질내 세균들을 억제하기 위한 목적으로 시험한 bacitracin sulfate, cefazolin, clindamycin phosphate, vancomycin은 높은 농도에서도 원충의 성장을 억제하지 않았기 때문에 선택 배지에 첨가물로써 사용 가능하다고 판정하였다(Table 2).

Table 2. Effects of Several Antimicrobial Agents on the Growth of *T. vaginalis* 14 Strains

Compound	Minimal conc. of growth inhibition	Commonly used dose*
Methylene blue	7.8 $\mu\text{g/mL}$	2.0 $\mu\text{g/mL}$
Sodium thioglycolate	1.0 mg/mL	1.0 mg/mL
Sodium benzoate	15.6 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Sodium azide	12.5 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Bacitracin sulfate	500 $\mu\text{g/mL}$ ↑	Variable
Cefazolin	500 $\mu\text{g/mL}$ ↑	Variable
Clindamycin phosphate	500 $\mu\text{g/mL}$ ↑	Variable
Pefloxacin	62.5 $\mu\text{g/mL}$	Variable
Vancomycin	500 $\mu\text{g/mL}$ ↑	10 $\mu\text{g/mL}$ ↓

\*commonly used doses as antiseptics or media supplement

Table 3. Growth Results of *T. vaginalis* 14 Strains after 48 Hours Culture

Strains	Modified Diamond medium suppl. 5% HEL* 5% HUS†	Modified Diamond medium suppl. 10% HOS†
G-1	$3.2 \times 10^5$	$2.56 \times 10^5$
G-2	$5.12 \times 10^5$	$4.48 \times 10^5$
G-3	$1.28 \times 10^6$	$1.28 \times 10^5$
G-4	$1.15 \times 10^6$	$1.92 \times 10^5$
G-5	$8.96 \times 10^5$	$1.92 \times 10^5$
G-6	$5.76 \times 10^5$	$7.68 \times 10^4$
G-7	$5.76 \times 10^6$	$3.84 \times 10^5$
G-8	$7.68 \times 10^5$	$1.60 \times 10^5$
G-9	$2.56 \times 10^5$	$2.43 \times 10^5$
G-10	$2.56 \times 10^5$	$1.47 \times 10^5$
G-11	$1.34 \times 10^6$	$1.54 \times 10^5$
G-12	$4.48 \times 10^5$	$2.56 \times 10^4$
G-13	$7.04 \times 10^5$	$1.41 \times 10^5$
G-14	$2.05 \times 10^6$	$2.62 \times 10^5$
Mean §	$1.1657 \times 10^6$	$2.0 \times 10^5$

\*Human erythrocyte lysate, †heat-inactivated human serum, ‡heat-inactivated horse serum, §Mean value of MDM suppl. 5% HEL & HUS is 5.8 fold of MDM suppl. 10% horse serum.

### 3. Modified Diamond medium에 5% 사람 적혈구 용해액과 5% 열 불활성화 사람 혈청 첨가시 성장 촉진 효과

Modified Diamond medium에 마혈청을 10% 첨가하는 대신에 세척한 사람적혈구 용해액과 56°C 30분 열처리한 사람 혈청을 각각 5% 되게 첨가하여 원충의 성장률을 측정된 결과, 배양 시작 48시간에 Table 3과 같이 대부분의 충주들이 더 빠른 성장률을 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 14 충주 가운데 가장 많이 성장한 G-7, 가장 적게 성장한 G-10과 14개 원충주의 평균에 가깝게 성장한 G-4를 선택하여 상기 두 배지에서의 성장 곡선을 그렸다. 3개 원충주 모두 사람 적혈구 용해액과 사람혈청을 첨가한 배지에서 더 빨리 성장하는 것을 확인하였다(Figure 3).

### 4. Modified Diamond medium의 첨가물 차이에 따른 질 트리코모나스 원충의 분리 배양성적, 세균 증식 및 효모 증식률의 차이

총 73개의 샘플 중에서 원충 11개 충주가 배양 분리되었다. Wet smear에서 양성을 보인 원충 2개 충주는 조합 A에서는 성장하지 못하였다. Wet smear에서 검출되지 않은 원충 1개 충주가 4개 조합 모두에서 성장하였다. Mycostatin이 함유된 A 조합에서는 wet smear에서 효모 양성이었던 7개 샘플 중에서 1개 충주만 소량 증식하였다. B 조합에서는 wet

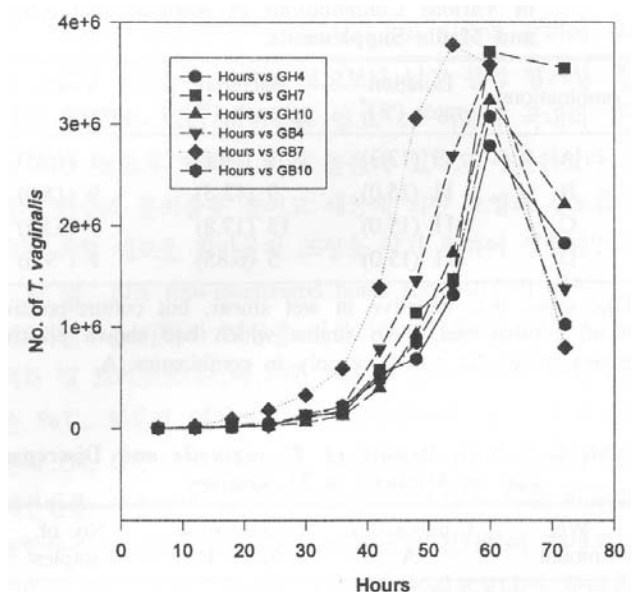


Figure 3. Growth curve of *T. vaginalis* (Initial inoculation counts are 5,000/mL). GB; MD medium+5% human rbc lysate & 5% heat-inactivated human serum, GH; MD medium+10% heat-inactivated horse serum.

smear에서 검출되지 않았던 효모 2개 군주가 더 검출되어 가장 높은 효모 증식률을 나타냈다. 세균의 증식이 가장 높은

빈도로 발생한 조합은 C조합이었다. 가장 낮은 세균 증식을 보인 조합은 D 조합이었다(Table 4~6).

**Table 4. Antimicrobial Agents and Media Supplements Combinations for *T. vaginalis* Isolation**

Combination A* : Penicillin G 1,500 unit/mL+streptomycin 1,200 $\mu$ g/mL+mycostatin 37.5 $\mu$ g/mL (188 USP unit)+modified Diamond medium suppl. 10% heat-inactivated horse serum
Combination B : Cefazolin 100 $\mu$ g/mL+streptomycin 1,200 $\mu$ g/mL+clindamycin 150 $\mu$ g/mL+modified Diamond medium suppl. 5% human erythrocyte lysate & 5% heat-inactivated human serum
Combination C : Bacitracin 14.6 unit/mL+streptomycin 1,200 $\mu$ g/mL+clindamycin 150 $\mu$ g/mL+modified Diamond medium suppl. 5% human erythrocyte lysate & 5% heat-inactivated human serum
Combination D : Vancomycin 10 $\mu$ g/mL+streptomycin 1,200 $\mu$ g/mL+clindamycin 150 $\mu$ g/mL+modified Diamond medium suppl. 5% human erythrocyte lysate & 5% heat-inactivated human serum

\* Commonly used antibiotic combination in modified Diamond medium

**Table 5. *T. vaginalis* Isolation Rates among 73 Samples in Various Combinations of Antimicrobial Agents and Media Supplements**

Combinations	Isolation rates (%) <sup>*</sup>	Bacterial growth (%)	Yeast growth (%)
A	9 (12.3)	7 (9.6)	1 (1.35)
B	11 (15.0)	9 (12.3)	9 (15.0)
C	11 (15.0)	13 (17.8)	5 (6.85)
D	11 (15.0)	5 (6.85)	7 (9.6)

\*One strain was negative in wet smear, but culture-positive in all combinations. Two strains which had shown positive in wet smear did not grow only in combination A.

**Table 6. Culture Results of *T. vaginalis* and Discrepancies by Methods in 73 Samples**

Wet mount	Combination A	Combination B, C, D	No. of samples
+	+	+	8
+	-	+	2
-	+	+	1
-	-	-	62

## 고찰

질 트리코모나스는 세계적으로 가장 흔한 비 바이러스성 성인성 질환으로써<sup>1)</sup>, 재감염되는 일이 흔한 성인성 질환이다<sup>3, 4)</sup>. 질 트리코모나스증은 여러 가지 주산기 합병증들 즉 저체중아, 조기진통, 조기 양막파수, 세균성 질증 유발, 비뇨생식기 감염, HIV의 전파의 증가와 관계가 있다고 보고되고 있다<sup>1, 2, 18)</sup>. 질 트리코모나스는 또한 다른 성인성 질환들과 증상이 유사하고 통상적으로 사용되는 wet smear, Pap smear, culture 등의 정확도가 떨어지기 때문에(PCR법 제외) 진단이 어려운 편이다<sup>1, 19, 20)</sup>. 질 트리코모나스증은 metronidazole에 대한 내성의 증가로 치료가 복잡해지고 있는 반면, 그 이환율은 최근 감소하고 있는 추세로써<sup>1, 2)</sup> 외국의 감염율

**Table 7. *Trichomonas vaginalis* Positive Cases (%) in Vaginal Flows<sup>\*</sup>**

Year	Wet smear (%)	Culture (%)	Medium used	Country
86	39/247 (15.8)	37/247 (14.9)	Modified Hollander fluid medium	USA
87	41/134 (30.1)	53/134 (39.5)	Diamond medium	Canada
88	34/88 (38.6)	32/88 (36.4)	Kupferberg medium	USA
89	65/375 (17.0)	92/375 (24.5)	Modified Diamond medium	USA
93	32/380 (9.4)	ND <sup>†</sup>		Thailand
96	76/615 (12.4)	93/375 (15.0)	Modified Diamond medium	USA
97	27/207 (13.0)	21/207 (10.2)	CPLM medium	Turkey
98	26/158 (16.45)	ND		India
99	3/177 (2.0)	6/177 (3.3)	Diamond medium	Korea
99*	18/142 (12.67)	17/142 (12.0)	Modified Diamond medium	This study

\*In author's result, wet smear is more sensitive than culture method, <sup>†</sup>ND; not done



은 지역과 검사 대상군에 따라 다르지만, 질 분비물의 증가를 주소로 내원하는 환자군들을 대상으로 wet smear와 배양을 시행한 결과는 Table 7과 같이 점차 감소하는 경향을 보이고 있다.

질 트리코모나스의 진단에 사용되는 방법은 직접 도말법, 염색법, 배양법, 면역학적 검사법, 분자생물학적 방법으로 대별할 수 있다. 각 방법들의 민감도와 특이도는 복잡하고 장비와 비용이 많이 필요할수록 높다. 배양법은 시간이 많이 소요되는 단점은 있지만, modified Diamond media 계열의 배지는 민감도가 95% 이상이 되는 것으로 알려져 있고, 현미경적 검사법과 함께 사용하면 100%에 이른다고 한다<sup>3)</sup>. 또한 충주를 얻기 위해서는 배양 이외의 방법은 없을 것이다. Borchardt 등<sup>21, 22)</sup>은 In pouch TV culture system과 Diamond medium, Trichosel medium의 질 트리코모나스 조기 배양 검출 실험에서 In pouch TV culture system이 우수함을 증명하였다. 현미경적 검사법과 적절한 배양법은 동시에 사용할 경우, 복잡하고 비용이 많이 드는 방법들에 비해서 여전히 우수한 진단 방법이라고 할 수 있다. 저자는 질 트리코모나스의 분리에 가장 흔히 사용되는 modified Diamond medium의 선택성을 증가시키고 원충의 성장을 촉진시켜 세균의 증식을 적절히 억제하는 배지의 조성을 찾고자 항생제의 조성을 달리하고 첨가물을 마혈청 대신에 냉동과 해동을 반복하여 용해시킨 사람 적혈구액과 56℃에서 30분간 열처리한 사람혈청을 각 5% 되게 첨가하였다. 사람혈청은 1:16 희석액을 원충  $4 \times 10^6$  cells/mL과 혼합하여 35℃에서 반응시킨 후, 응집이 일어나지 않은 혈청을 사용하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 48시간 배양후 5% 사람적혈구 용해액과 5% 사람혈청을 첨가한 경우에 평균 5.8배의 성장 증가를 보였다. 또한 G-4, G-7, G-10 3 충주를 대상으로 성장 곡선을 그린 경우에도 G-4, G-7의 성장이 더 빨랐다. 이러한 결과는 적혈구가 원충의 성장과 증식에 필요한 철분과 지질들을 공급한다는 Lehker 등<sup>23, 24)</sup>의 보고를 뒷받침하여 준다고 볼 수 있다.

Table 5에서 보는 바와 같이 통상 많이 사용되는 조합 A에서는 총 73개의 샘플중에서 wet smear에서 양성을 보인 원충 2 충주가 성장하지 못하였다. 즉 배양된 충주 총 11주 중에서 9주가 조합 A에서 성장함으로써 81.8% (9/11)의 민감도를 나타내었다. 나머지 조합들에서는 wet smear에서 검출되지 않은 원충 1 충주를 포함해서 조합 A에서 자라지 않은 2 충주 등 11 충주 모두가 성장함으로써 100% 민감도를 보였다. Wet smear의 민감도는 90.9% (10/11)로 wet mount의 민감도를 검사자의 능력에 따라 38~79%로 보고한 Sch-

mid<sup>14)</sup>의 보고보다는 월등히 높고 조합 A modified Diamond medium의 분리 성적보다 높다(Table 6). 샘플의 수가 비교적 적기 때문에 이러한 민감도를 그대로 받아들이기에는 무리가 있을 수 있다. 그러나 신중한 표본 준비와 현미경적 검경은 wet mount의 민감도를 현저히 높일 수 있다고 생각한다. Mycostatin이 함유된 조합 A에서는 wet smear에서 효모 양성이었던 7개 샘플 중에서 1개 충주만 소량 증식하였다. B 조합에서는 wet smear에서 검출되지 않았던 효모 2개 군주가 더 검출되어 가장 높은 효모 증식률을 나타냈다. 또한 세균의 증식이 가장 높은 빈도로 발생한 조합은 Bacitracin을 함유한 C조합이었다. Vancomycin을 함유한 조합 D는 세균의 동시 증식률이 가장 낮았다. 이러한 결과를 바탕으로 유추하여 추천할 수 있는 선택성이 높은 질 트리코모나스 배지의 조성은 5% human erythrocyte lysate와 5% heat-inactivated human sera (질 트리코모나스에 대한 항체가 전혀 없는)를 첨가한 modified Diamond medium으로써 vancomycin HCl 100 µg/mL, streptomycin sulfate 1,200 µg/mL, clindamycin phosphate 150 µg/mL, mycostatin 37.5 µg/mL을 항균제로 부가한 pH 6.2의 배지이다.

## 요 약

**목 적 :** 질 트리코모나스 원충의 분리에 흔히 사용되고 있는 modified Diamond medium은 10% 마혈청, penicillin G, streptomycin, mycostatin이 첨가되어 있다. 저자들은 이 배지의 조성을 국내에서 질 트리코모나스의 원충의 분리에 사용해 오면서 분리율이 외국의 보고보다 낮고 통성 혐기성 세균들에 오염되는 일이 빈번함을 알고, 그 이유가 국내의 항균제 내성 정도가 외국에 비해 높은데 있다고 추론하였다. 따라서 원충의 분리율을 높이고 세균에 의한 오염의 정도를 줄이기 위한 새로운 첨가물의 조성을 찾기 위하여 실험하였다.

**방 법 :** 10% heat-inactivated horse serum대신에 세척한 사람 적혈구를 냉동과 해동을 반복하여 용해시킨 적혈구 용해액과 질 트리코모나스에 대한 항체가 없는 신선한 사람 혈청을 56℃, 30분간 열처리하여 불활성화시켜 각각 5%씩 첨가하여 G4, G7, G10 원충주를 대상으로 성장의 정도를 혈구 계산판을 사용하여 측정 비교하였다. 또한, 4가지 항균제의 조합들을 modified Diamond medium에 첨가하여 73명의 질 분비물 증가 환자들을 대상으로 질 트리코모나스 분리율과 세균 및 진균의 오염 정도를 시험하였다.

**결 과 :** 5% 사람적혈구 용해액과 5% heat-inactivated human serum을 10% horse serum대신에 첨가할 경우, 48시간

배양후, 원충들의 성장이 현저히 촉진되었다(평균 약 5.8배). 이 결과를 바탕으로 4가지 항균제 조합들의 질 트리코모나스 분리율을 비교한 결과, 조합 A는 9/73 (12.3%)였으며, 조합 B, C, D는 모두 11/73 (15%)였다. 세균 오염이 가장 적은 조합은 조합 D였다.

**결 론 :** 5% 사람적혈구 용해액과 5% heat-inactivated human serum을 첨가하고, 항균제로 vancomycin HCl 100 µg/mL, streptomycin sulfate 1,200 µg/mL, clindamycin phosphate 150 µg/mL, mycostatin 37.5 µg/mL을 첨가하여 pH를 6.2로 조정한, 새로운 modified Diamond medium이 질 트리코모나스 원충의 분리에 보다 적절한 배지인 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Delgaty PD, Bhatt KR, Garber G: *Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 11:300-317, 1998
- 2) Carr PL, Felsenstein D, Friedman RH: *Evaluation and management of vaginitis*. J Gen Intern Med 13:335-346, 1998
- 3) Heine P, McGregor JA: *Trichomonas vaginalis: A re-emerging pathogen*. Clin Obstet Gynecol 36:137-144, 1993
- 4) Thomason JL, Gelbart SM, Sobun JF, Schulien MB, Hamilton PR: *Comparison of four methods to detect Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 26:1869-1870, 1988
- 5) Hardy PH, Nell EE, Spence MR, et al.: *Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome*. Lancet 2:333-337, 1984
- 6) Minkolf H, Grunebaum AN, Schwarz RH, et al.: *Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: A prospective study of the vaginal flora in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 150:965-972, 1984
- 7) Hume JC: *Trichomoniasis-Eight reasons why you should take it seriously*. Medical Times 106:59-63, 1978
- 8) James JA, Thomason JL, Gelbart SM, Osipowski P, Keiser P, Hanson L: *Is trichomoniasis often associated with bacterial vaginosis in pregnant adolescents?* Am J Obstet Gynecol 166:859-863, 1992
- 9) Krieger JN, Verdon M, Siegel N, Critchlow C, Holmes KK: *Risk assessment and laboratory diagnosis of trichomoniasis in men*. J Infect Dis 166:1362-1366, 1992
- 10) Keith LG, Friberg J, Fullan N, Bailey R, Berger GS: *The possible role of Trichomonas vaginalis as a "vector" for the spread of other pathogens*. Int J Fertil 31:272-277, 1986
- 11) Pindak FF, Pindak MM, Hyde BM, Gardner JR WA: *Acquisition and retention of viruses by Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 65:366-371, 1989
- 12) Grossman III JH, Galask RP: *Persistent vaginitis caused by metronidazole resistant trichomonas*. Obstet Gynecol 76:521-522, 1990
- 13) Gelbart SM, Thomason JL, Osypowski PJ, James JA, Hamilton PR: *Comparison of Diamond's medium modified and Kupferberg medium for detection of T. vaginalis*. J Clin Microbiol 27:1095-1096, 1989
- 14) Schmid GP, Matheny LC, Zaidi AA, Kraus SJ: *Evaluation of six media for the growth of Trichomonas vaginalis from vaginal secretions*. J Clin Microbiol 27:1230-1233, 1989.
- 15) Philip A, Carter-Scott P, Rogers C: *An agar culture technique to quantitate Trichomonas vaginalis from women*. J Infect Dis 155:304-308, 1987
- 16) Meingassner JG, Mieth H, Czok R, Lindmark DG, Müller M: *Assay conditions and the demonstration of nitroimidazole resistance in Trichomonas foetus*. Antimicrob Agents Chemother 13:1-3, 1978
- 17) Victor L: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed., New York, Williams & Wilkins, p962, 1991
- 18) Minkoff HL, Eisenberger-Matityahu D, Feldman J, Burk R, Clarke L: *Prevalence and incidence of gynecologic disorders among women infected with human immunodeficiency virus*. Am J Obstet Gynecol 180:824-836, 1999
- 19) Ryu JS, Chung HL, Min DY, Cho YH, Ro YS, Kim SR: *Diagnosis of trichomoniasis by polymerase chain reaction*. Yonsei Med J 40:56-60, 1999
- 20) Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA: *Diagnosis of Trichomonas vaginalis infection by PCR using vaginal swab samples*. J Clin Microbiol 36:3250-3210, 1998
- 21) Drafer D, Parker R, Patterson E, Jones W, Beutz M, French J, Borchardt K, McGregor J: *Detection of Trichomonas vaginalis in pregnant women with the In Pouch TV culture system*. J Clin Microbiol 31:1016-1018, 1993
- 22) Borchardt KA, Zhang MZ, Shing H, Flink K: *A comparison of the sensitivity of the In Pouch TV, Diamond's and Trichosel media for detection of Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 73:297-298, 1997
- 23) Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF: *Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for Trichomonas vaginalis*. J Exp Med 171:2165-2170, 1990
- 24) Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF: *The regulation by iron of the synthesis of adhesins and Cytoadherence levels in the protozoan Trichomonas vaginalis*. J Exp Med 174:311-318, 1991
- 25) 양남웅, 정석진, 임 용: *질 트리코모나스증의 치료에 효과적인 약제의 탐색*. 감염 28:329-341, 1996



