

고위험병원체 결핵균의 신속진단을 위한 액체배양시스템 평가

김진숙^{1,2} · 김승철^{4*} · 전보영³ · 박승규⁵

¹식품의약품안전청, ²중앙대학교 생명과학과, ³연세대학교 의과대학 면역질환연구소, ⁴화학방어연구소, ⁵국립마산병원

본 연구에서는 객담 내 결핵균의 배양시험과 약제 감수성 시험 방법으로서 BacT/Alert 액체 배지, Ogawa 배지 및 Löwenstein-Jensen 배지 배양법을 비교하였다. 신속 액체배양시스템은 기존의 Egg-based media (Ogawa, Löwenstein-Jensen 배지)에 비해 높은 민감도와 빠른 배양으로 결핵환자의 초기 객담 검사와 약제 감수성 시험에 널리 사용되어 왔다. 객담은 N-Acetyl-L-cystine과 4% NaOH로 처리한 후 BacT/Alert 액체 배지 시스템과 Ogawa 배지에 접종하고 배양하여 비교하였다. 결핵 환자 객담 검체 135개 중 도말검사결과 양성으로 95개였고, Ogawa 배지 배양결과 양성으로 확인된 수는 89개(65.9%)였으며, BacT/Alert 액체 배지에서는 97개(71.9%)가 양성으로 확인되었다. 결핵균 배양 양성 검체의 평균배양일은 Ogawa 배지에서 22.4일, BacT/Alert 액체 배지는 11.3일로 단축되는 것을 확인하였다. 약제 감수성 시험에는 32개 결핵균주를 이용하였으며, isoniazid를 첨가한 BacT/Alert 액체 배지와 Löwenstein-Jensen 배지에서의 약제 감수성 시험 검사결과 일치률은 87.5%를 보였고, rifampicin에서의 일치률은 90.6%로 나타났다.

Key words □ acid fast bacilli (AFB), BacT/alert process system, isoniazid (INH), *M. tuberculosis*, rifampicin (RIF), sputum culture, drug susceptibility test (DST)

세계보건기구의 예측자료에 의하면 전세계 61억 인구 중 약 1/3인 20억 명이 결핵균에 이미 감염되어 있고, 매년 전세계 인구의 약 1%가 새로이 결핵균에 추가 감염되어 감염자군으로 유입되는 상태에 있다고 한다. 또한 이들 감염자 중에서 8백만 명 이상의 신환자가 매년 발병되고, 2백만 명 이상의 환자가 결핵으로 사망하는 것으로 보고되었다(6).

우리나라에서도 2007년 3월 보건복지부가 발표한 결핵발생률은 인구 10만 명당 90명 꼴로 일본(30명)에 비해 3배, 미국(5명)에 비해 18배나 높고, 사망률 또한 인구 10만 명당 10명 꼴로 일본(4명) 2.5배, 미국(1명 미만)에 비해 100배 이상 높은 것으로 발표되었다. 우리나라는 OECD 가입국(30개국) 중 결핵발생률 및 사망률에서 불명예스럽게도 1위를 차지하였다. 이에 국가 및 국민들이 결핵에 대한 관심이 더욱 높아지게 되었으며, 결핵의 보다 신속한 진단과 치료가 절실히 필요하게 되었다.

결핵의 추정진단은 병력, 임상 및 방사선 소견, 그리고 도말검사 항산성 간균(Acid-Fast Bacilli, 이하 AFB)의 존재에 근거하여 판단될 수 있으나, 결정적인 진단은 검체에서 결핵균의 분리 및 동정에 의거한다. 전통적인 동정과정은 최소한 6주가 소요된다.

1990년에 들어서면서 결핵진단 시 검사기간 단축을 위해 환자의 검체를 24시간 내에 도말 검경하고 10일에서 14일 이내에 결핵균 배양 및 분리를 함으로써, 15일내지 30일 내에 항결핵제 내성시험을 완료하는 검사 기간 단축 시험법이 시도되었다(10). 그 외에 여러 가지 신속한 검사방법이 개발되어 현재 이용되고

있는데 임상 검체에서 AFB를 직접 검출하기 위한 방법으로 형광염색법(auramine rhodamin) 등이 이용되어 왔으며, 신속한 배양방법 및 신속 배양된 균주의 규명을 위해 IS6110 fingerprinting을 이용한 분자생물학적인 분석이 개발되어 이용되고 있다(5, 7, 8). 이렇게 결핵균 검사를 실시하는 많은 검사실에서 기존의 고체배지 배양법에서 액체배지 배양법으로 전환 후 결핵 환자 관리에 있어서 괄목할 만한 질적 향상이 있어왔다.

본 과제에서는 액체배양시스템인 BacT/Alert process system을 이용하여 결핵환자의 검체로부터 결핵균을 신속분리배양하고 내성결핵균의 약제 감수성시험을 실시하여 결핵균 다제내성 등의 신속진단을 연구하였다.

재료 및 방법

연구대상

2003년 5월부터 9월까지 국립 마산 결핵 병원에서 결핵환자로 진단받고 입원된 신환자를 중심으로 의뢰된 135 검체를 대상으로 하였다.

결핵균에 대한 약제 감수성시험에서 비교균주로서 모든 항결핵제 감수성균주인 H₃₇Rv (ATCC 27294)는 서울 연세대학교 의과대학 미생물학교실이 ATCC에서 분양받아 배양한 균주를 제공받아 사용하였다.

검체 전처리

결핵환자에서 채취한 객담은 50 ml Falcon polypropylene tube에 수집하여 2~3시간 이내에 처리를 완료하였다. 객담에 동량의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-2008-6270, Fax: 82-2-3412-8064
E-mail: hisckim@naver.com

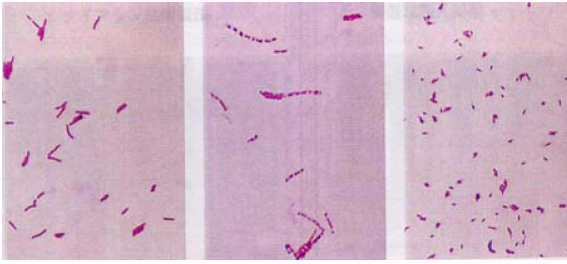


Fig. 1. The detection of acid fast bacilli in stained smears.

N-Acetyl-L-cystine (이하 NALC)를 넣어 객담을 용해시킨 후, 객담과 동량으로 4% NaOH를 첨가하고 객담이 충분히 풀어지도록 15분간 vortexing하였다. 혼합액에 멸균된 0.067 M phosphate buffer (pH 6.8, 이하 PBS)를 2.5배 첨가하여 혼합한 후 4,300 rpm, 4°C, 20분간 원침하였다. 상층액은 폐기하고 남은 침사에 멸균된 PBS를 첨가한 후 BacT/Alert 배양병 및 Ogawa 배지에 접종하였다.

항산균염색

유리슬라이드에 침사를 직경 약 1~2 cm로 도말 한 후 15분 동안 건조시키고 Ziehl-Neelsen법으로 항산균 염색을 실시하였으며, 현미경 1,000배 시야에서 전시야를 검경하였다(Fig. 1). 검경기준은 국제항결핵연맹에서 제시된 기준표를 사용하였다(Table 1).

액체 및 고체배지를 이용한 결핵균 배양시험

액체배지를 이용한 배양시험

침사를 BacT/Alert 배양병(Biomérieux, Inc. Durham, NC 27704)에 접종한 후 BacT/Alert process system에서 배양하였다. 액체배지인 BacT/Alert 배양병 구성 성분은 10 ml의 modified Middlebrook 7H9 broth에 pancreatic digest of casein, bovine serum albumin, catalase, oleic acid, glycerol, 및 bovine serum albumin 등에 결핵균만 선택적으로 자라고 다른 미생물은 생육을 저지할 수 있도록 제조된 항생제 혼합물인 amphotericin B, azlocilin, nalidixic acid, polymyxin B, trimethoprim, vancomycin 성분을 포함한 supplement를 접종하기 전에 첨가하였다(3).

BacT/Alert process system은 PC에 연결하였고, 각각의 BacT/

Table 1. Acid-fast smear evaluation and reporting

Numbers of AFB observed	Fuchsin stain × 1,000	
0	Negative for AFB	(-)
1-2/300 Fields	Number seen	(±)
1-9/100 Fields	Average no./100 Fields	(1+)
1-9/10 Fields	Average no./10 Fields	(2+)
1-9/Field	Average no./Fields	(3+)
>9/Field	Greater than 9/Field	(4+)

Source : KENT, P.T. and G.P. Kubica. 1985. Public Health Mycobacteriology : a Guide for the Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga



Fig. 2. Löwenstein-Jensen media including anti-tuberculosis drugs.

Alert 배양병은 bar code로 등록하여 system에서 37°C로 배양하였다. 결핵균이 배양되면서 방출되는 CO₂는 gas-permeable sensor가 각 BacT/Alert 배양병 바닥에 있는 colorimetric indicator를 통해 탐지함으로써 배양병 내의 균 배양 상태를 확인하였다(Fig. 3).

자동으로 24시간 monitoring하여 균수가 1.0×10⁶ colony forming unit 정도 배양되어지면 양성으로 확인하며 만약 정해진 기간(42일) 이내에 양성으로 탐지되지 않으면 음성으로 인식된다(8).

BacT/Alert process system을 이용한 결핵균 배양의 장점은 이미 제조된 배지를 사용하는 정확함과 편리함이 있고 검출시간이 빠르다는 점에서 큰 장점이 있으며 배양정보가 자동 저장됨으로 24시간 모니터가 가능하고 비방사선 배양검출 방법이므로 안전하게 검사할 수 있다.

고체배지를 이용한 배양시험

전처리된 검체를 Ogawa 배지에 접종하여 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양상태 점검은 1주에 2번씩 8주 동안 균 집락 형태 및 색깔을 통해 충분히 판단하였다. 인형 결핵균만이 양성을 나타내는 niacin 시험은 Ogawa 배지에서 8주까지 배양한 후 1 ml의 멸균된 증류수에 0.5 ml의 10% cyanogen bromide와 0.5 ml의 4% aniline alcohol을 넣고, 5분후 액체가 황색으로 변하면 양성으로 판단하였으며, 실시할 때마다 양성 및 음성균주로 대조시험하였다. 배양에 이용한 배지는 Ogawa 배지이며 객담 내 결핵균의 배양에 사용하였다.

결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex)은 크게 사람에게 폐결핵을 일으키는 *Mycobacterium tuberculosis*와 우형결핵을 일으키는 Nontuberculous mycobacterial (이하 NTM)로 분류할 수 있다.

*M. tuberculosis*와 NTM과의 구별은 1차적으로 균집락 및 색깔을 통하여 실시 되어왔다. 고체배지상에서 *M. tuberculosis*의 집락모양은 무광택의 거친 표면의 부서지기 쉬운 모양을 하며 고형 치즈 조직과 유사한 모양을 보이고, NTM 집락 모양은 오렌지 색깔이나 광택을 가지며 둥글고 미끈한 모양을 보인다.

액체 및 고체배지를 이용한 isoniazid/rifampicin 약제 감수성 시험

약제 감수성 시험에 사용된 약제는 isoniazid와 rifampicin이며 이들 약제는 결핵치료의 기본적인면서도 중요한 일차약제로 사



Fig. 3. Liquid culture system (BacT/Alert process system).

용되어진다. 두 약제에 내성이 있는 결핵균 multi-drug resistance tuberculosis (이하 MDR-TB)를 갖고 있는 환자의 경우 치료의 상당한 어려움이 있어 이 두가지 약제에 대한 감수성 시험 결과는 초기 치료에 매우 중요하다(5).

약제 감수성 시험에서는 32개의 배양균주를 사용하였으며 BacT/Alert 배양병에 supplement 0.5 ml을 첨가하고 항결핵 약제 isoniazid (Sigma 54-85-3)를 최종 농도 1 µg/ml, rifampicin (Sigma 13292-46-1) 최종농도 1 µg/ml 되도록 하여 사용하였다. 비교균에는 supplement는 첨가하지만 약제는 첨가하지 않았다.

배양 양성으로 탐지된 배양 균액 100 µl를 isoniazid와 rifampicin을 각각 첨가한 BacT/Alert 배양병에 syringe을 이용하여 접종한 후에 BacT/Alert process system에서 배양하고 24시간 동안 배양상태를 모니터링하였다.

대조균과 동일하거나 빠르게 양성으로 검출되면 내성이라고 판정하였고, 대조균보다 늦게 양성으로 검출되거나 음성으로 검출되면 그 해당약제에 감수성이 있는 것으로 판정하였다.

약제 감수성 시험의 대조균으로 사용하기 위해서 약제 isoniazid와 rifampicin을 각각 함유한 Löwenstein-Jensen 배지에 결핵균액 50 µl를 접종하여 37°C 배양기에 배양하였다. 4주(28일) 이내에 집락과 배양상태를 확인하여 자라게 되면 그 해당약제에 내성이 있다고 판단하였고 배양되지 않았으면 감수성이 있는 것으로 판단하였다(Fig. 2).

결핵균에 대한 약제 감수성 시험에서 비교균주로서 모든 항결핵제 감수성균주인 H₃Rv (ATCC 27294)를 이용하였고, 비교 약제는 isoniazid, rifampicin이 함유된 Löwenstein-Jensen 배지를 사

Table 2. Comparative of culture methods for *M. tuberculosis* from sputum samples

Microscopy (1000×)	Ogawa medium	BacT/Alert process system
	No (%) of positive isolates	No (%) of positive isolates
Smear (-) (n=40)	5/135 (3.7%)	9/135 (6.7%)
Smear (+) (n=95)	84/135 (62.2%)	88/135 (65.2%)
Total (n=135)	89/135 (65.9%)	97/135 (71.9%)

Table 3. Duration of cultivation for *M. tuberculosis* from sputum samples

Microscopy	Ogawa medium	BacT/Alert process system
	Duration (mean time: days)	Duration (mean time: days)
Smear (-) (n=40)	13 - 30 (24.4 days)	11 - 36 (21.3 days)
Smear (+) (n=95)	19 - 45 (22.4 days)	8 - 34 (11.3 days)

용하였다(4).

결 과

도말검사 및 액체/고체배지 배양시험 결과

전체 135개의 객담 검체 중 객담도말검사결과에서 도말양성으로 관찰된 검체는 95개였다. 동일 검체를 Ogawa 배지에서 배양하여 niacin 시험을 실시하여 확인한 결과 양성으로 검출된 수는 89개로서 65.9%였다. BacT/Alert process system에서는 솔젠트사의 *Mycobacterium tuberculosis* detection kit를 사용하여 결핵균을 탐지하였다. 보조적으로 PCR을 추가 실시하였으며 결핵균에 특이적으로 존재하는 IS6110 부위를 증폭하여 확인한 양성 결과는 97개(71.9%)였다. 객담도말검사결과에서 도말검사 음성으로 관찰된 객담 40개중 Ogawa 배지에서는 5개, BacT/Alert process system에서 9개가 배양양성으로 검출되어 도말검사결과 음성 검체를 대상으로 배양검출율을 비교하면 BacT/Alert process system이 Ogawa 배지를 이용한 배양보다 약 2배 정도 배양검출률이 높음을 보여주었다(Table 2). 그리고 95개 도말검사결과 도말양성인 검체의 결핵균 배양 평균일이 Ogawa 배지에서는 22.4일이었으며, BacT/Alert process system에서의 평균 배양일은 11.3일로서 배양기간도 고체배지보다 액체배지인 BacT/Alert process system에서 약 1/2로 단축되었다(Table 3).

액체 및 고체배지를 이용한 isoniazid/rifampicin 약제 감수성 시험 결과

BacT/Alert process system에서 배양 양성으로 검출된 균액을 즉시 항결핵제가 첨가된 BacT/Alert 배양병에 접종하여 isoniazid 또는 rifampicin의 약제 감수성 시험을 실시하였으며, 약제 감수성 시험 결과의 비교 및 판정은 isoniazid 또는 rifampicin이 함유된 Löwenstein-Jensen 배지에서의 감수성 시험결과와 비교하였다(Table 4).

약제감수성 시험에 사용된 결핵균주는 32개로서, 일차약제인

Table 4. Antituberculous drugs and their concentrations used for drug susceptibility testing

Drugs	Löwenstein-Jensen media (µg/ml)	BacT/Alert process system (µg/ml)
Isoniazid	0.2	1
Rifampicin	40	1

Table 5. Concordant rate between the BacT/Alert process system and Löwenstein-Jensen media for DST concordant rate

Drugs	Sensitivity
Isoniazid	87.5% (28/32)
Rifampicin	90.6% (29/32)

isoniazid와 rifampicin을 이용하여 BacT/Alert process system과 전통적 방법인 Löwenstein-Jensen 배지와 결과 일치율을 비교하였다. Isoniazid의 감수성 시험 결과 BacT/Alert process system과 Löwenstein-Jensen 배지와 결과 일치율은 87.5% (28/32)를 보였고, rifampicin의 감수성 시험결과 일치율은 90.6% (29/32)로 나타났다(Table 5).

고 찰

연구 대상은 치료 중인 환자들을 대상으로 하였으며, 채취된 총 135 객담검체를 도말검사한 결과 95개 검체가 도말양성으로 검정되었다. 그 중에 BacT/Alert process system에서는 97/135 (71.9%)을 나타냈고 Ogawa 배지에서는 89/135 (65.9%)의 검출률을 보였다. 평균배양기간은 BacT/Alert process system에서는 11.3일, Ogawa 배지에서는 22.4일이라는 결과를 비교해 볼 때, 평균배양기간은 BacT/Alert process system을 이용했을 때가 Ogawa 배지를 이용했을 때 보다 2배 이상 단축됨을 관찰하였다. 도말 검사 결과와 배양 결과가 다른 경우는 135건 중 7~11건으로 나타났는데, 그 원인은 결핵환자를 지속적으로 치료하게 되면서 치료받은 환자의 객담에서 죽은 균이 포함되어 도말검사결과에서는 양성이나, 배양검사결과에서는 음성으로 관찰되는 경우가 있기 때문이다.

배양된 균주 중 32개 결핵균 균주를 약제 감수성시험에 이용하였으며, 사용된 약제는 항결핵 약물요법 중에 가장 기본적인 서도 중요한 일차약제인 isoniazid와 rifampicin을 사용하였다. Isoniazid는 화학명으로는 isonicotinic acid hydrazide이며 작용기전은 결핵균의 세포벽의 주성분인 mycolic acid의 합성을 억제하여 항결핵 작용을 한다. rifampicin은 *Streptomyces mediterranei*에 의해서 생성되는 자연발생 항생물인 rifamycin B의 반합성유도체로서 작용기전으로는 DNA dependent RNA polymerase의 β -subunit에 친지성결합을 하기 때문에 모든 종류의 RNA 합성을 신속히 억제함으로써 항결핵작용을 나타낸다고 알려져 있다(1). 항결핵제인 isoniazid를 첨가한 BacT/Alert process system에서의 내성결과와 항결핵제인 isoniazid가 함유된 Löwenstein-Jensen 배지에서 내성결과에 일치율은 87.5% (28/32)를 보였으며 rifampicin을 첨가한 BacT/Alert process system에서의 내성결과와 rifampicin을 함유한 Löwenstein-Jensen 배지에서의 내성결과에 일치율은 90.6% (29/32)를 보여, 실제 임상진단에의 적응도 고려해 볼 수 있었다. 기존의 방법인 Löwenstein-Jensen 배지와 가까운 결과의 일치성을 보이면서도 평균배양기간을 대폭 줄일 수 있으므로 BacT/Alert process system의 활용이 결핵 환자의 진단

방법에 효율적인 것으로 판단되었다. 결핵환자의 치료는 대부분 약물치료가 추가 되고 있으므로 결핵균의 빠른 분리 검출과 내성검사결과 확인은 상당히 중요하며 그래서 객담속의 결핵균 배양의 시간 단축은 중요한 의미를 지닌다고 하겠다.

본 연구에서는 고위험병원체로서 결핵균 진단을 위한 진단방법으로서 액체배양법인 BacT/Alert process system과 고체배양법인 Ogawa 배지를 이용하여 배양 및 약제내성결핵균의 진단을 위한 항결핵제 내성 진단 기간을 연구하였다. 액체배양법을 이용하였을 때 결핵균의 배양기간과 항결핵제 내성시험 진단결과, 소요 시간이 고체배지를 이용한 배양법보다 2배에서 4배 정도 신속 진단됨을 확인하였다.

참고문헌

1. 김상재, 홍영표. 결핵(제4판). 1993.
2. 통계청. 2001년 사망원인통계연보.
3. Benjamin, Jr., W.H., K.B. Waites, A. Beverly, L. Gibbs, M. Waller, S. Nix, S.A. Moser, and M. Willert. 1998. Comparison of the MB/BacT system with a revised antibiotic supplement kit to the BACTEC 460 system for detection of Mycobacteria in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3234-3238.
4. Daz-Infantes, M.S., M.J. Ruiz-Serrano, L. Martinez-Snchez, A. Ortega, and E. Bouza. 2000. Evaluation of the MB/BacT mycobacterium detection system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1988-1989.
5. Diel, R., S. Schneider, K. Meywald-Walter, C.M. Ruf, S. Risch-Gerdes, and S. Niemann. 2002. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: Long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological Techniques. *J. Clin. Microbiol.* 40, 532-539.
6. Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M.C. Raviglione. 1999. Global burden of tuberculosis : estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 282, 677-686.
7. McCarter, Y.S. and A. Robinson. 1994. Detection of acid-fast bacilli in concentrated primary specimen smears stained with rhodamine-auramine at room temperature and at 37 degrees C. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2487-2489.
8. Piersimoni, C., C. Scarpato, A. Callegaro, C.P. Tosi, D. Nista, S. Bornigia, M. Scagnelli, A. Rigon, G. Ruggiero, and A. Goglio. 2001. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a Multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 39, 651-657.
9. Syre, H., S. Phyu, P. Sandven, B. Bjorvatn, and H.M.S. Grewal. 2003. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5173-5177.
10. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsburgh, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis : Is your laboratory ready. *J. Clin. Microbiol.* 31, 767-770.
11. WHO report. 2008. Global Tuberculosis Control. surveillance, planning, financing. *World Health Organization*.

(Received July 27, 2009/Accepted August 24, 2009)

ABSTRACT : Evaluation of Liquid Culture System in Sputum Culture and Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis***Jin-Sook Kim^{1,2}, Seung-Cheol Kim^{4*}, Bo-Young Jeon³, and Seung-Kyu Park⁵**

(¹Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Republic of Korea, ²Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea, ³Institute for Immunology and Immunological Disease, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Republic of Korea, ⁴Chemical Defence Research Institute, Seoul 137-180, Republic of Korea, ⁵National Masan Hospital, Masan 631-710, Republic of Korea)

In this study, we compared the BacT/Alert liquid culture system with Ogawa and Löwenstein-Jensen (L-J) media for sputum culture and drug susceptibility test (DST) of *Mycobacterium tuberculosis*. Rapid liquid culture systems have been widely employed both for primary cultures of *M. tuberculosis* from clinical specimens and for drug susceptibility test because of its greater sensitivity and faster turn-around time than the conventional egg-based culture methods (Ogawa, Löwenstein-Jensen media). Sputum specimens were decontaminated with N-acetyl-L-cysteine (NALC)-4% NaOH and inoculated into the BacT/Alert culture bottles and Ogawa media. 95 from among 135 sputa were smear-positive, 97 (71.9%) were culture-positive by the BacT/Alert culture system, while 89 (65.9%) were positive by Ogawa media. The mean time to culture-positive by the BacT/Alert process system was about 11.3 days, which was significantly shorter than that by Ogawa media (22.4 days). Of 32 *M. tuberculosis* cultures examined for drug sensitivity, the concordant rate between the two methods (BacT/Alert liquid culture system, Löwenstein-Jensen media) ranged from 87.5% for isoniazid and 90.6% for rifampicin.