

체액에서 배양 방법에 따른 결핵균 검출율의 비교

최 윤 미

서울보훈병원 진단검사의학과

Evaluation of MGIT 960 System for Recovery of Mycobacteria from Body Fluids

Youn Mi Choi

Department of Laboratory Medicine, Seoul Veterans Hospital, Seoul, Korea

Background: In this study, we evaluated the BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md, USA), which is fully automated, noninvasive and nonradiometric fluorescent indicator broth detection system, for the growth and detection of mycobacteria with body fluid specimens.

Methods: Total of 1,891 body fluid specimens were included (pleural fluid 752, ascitic fluid 629, cerebrospinal fluid 214, joint fluid 79, peritonzil 54, others 163). Specimens were inoculated into MGIT and solid media (3% ogawa, Japan). Polymerase chain reaction was performed for the discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT).

Results: A total of 62 isolates of mycobacteria were recovered from all culture system. With MGIT system, 56 isolates were recovered, compared with solid system recovered 33 isolates. 29 isolates were recovered with MGIT only and 6 isolates recovered with solid media only. Among 62 isolates recovered, 11 isolates were positive in acid fast stain. 10 isolates were recovered with MGIT. One isolate was recovered with solid system. 51 isolates were negative in acid fast stain. Among this, 46 isolates were recovered with MGIT. The mean detection time was 14.2 days with MGIT system, and 38.2 days with solid media. Contamination rate for each system with body fluid specimens were 4.1% for MGIT and 1.7% for solid media.

Conclusion: In body fluid, the MGIT system has the advantages of improved detection rate and rapid recovery than solid media to recover mycobacteria.

(Korean J Clin Microbiol 2003;6(1):69-73)

Key words : MGIT 960 system, Solid media, Mycobacteria, Body fluid

서 론

결핵은 우리 나라에서 유병율이 높은 전염성 질환이다. WHO 통계에 의하면 전세계 인구 중 삼분의 일인 약 17억명이 결핵에 이환되어 있고, 해마다 새로운 결핵 감

염 환자가 생겨나고 있다[1].

최근 들어 분자생물학적 기법의 발달로 여러 가지 다양한 결핵균 검출법이 소개되고 있지만, 예전부터 현재 까지 가장 신뢰할 만한 검출법은 결핵균을 배양하여 균의 존재 유무를 알아보는 것이다. 전통적인 배양법은 고체 배지를 이용하여 균을 배양하는 것이다. 하지만 한 달 이상의 시간이 소요되어 환자의 진단과 치료 방침을 결정하는 데는 많은 어려움이 있었다. 최근에는 액체 배지를 이용한 배양법이 소개되어 빠른 시간 내에 결핵균을 배양할 수 있을 뿐만 아니라 검출률도 많이 향상되었다 [2-4]. 우리 나라에는 액체 배지를 이용한 결핵균 배양 방

접수번호 : CM 6-1-07

교신저자 : 최윤미

(134-791) 서울시 강동구 둔촌동 6-2

서울보훈병원 임상병리과

TEL : (02) 2225-1459 FAX : (02) 2225-1459

E-mail : ymchoi2000@yahoo.co.kr

법으로 BACTEC 460 기기가 처음으로 소개되어 이용되었는데, 방사선 동위원소를 이용하여 침습적으로 균의 성장 유무를 알아 보기 때문에 폐기물 처리 및 오염 문제가 제기되고 있다[5-7]. 최근에 액체 배지 내에 형광 물질을 첨가하여 균이 성장함에 따라 산소가 소모됨에 따라 형광을 발하여 외부에서 형광의 발광 정도에 따라 비침습적으로 균 성장 유무를 알 수 있는 방법이 개발되어 검출 시간의 단축과 검출률 향상에 많은 기여를 하고 있다[8-11]. 하지만 높은 오염율, 고가의 기기 및 비싼 재료비 때문에 아직 널리 보급되어 있지 않다.

결핵균이 주로 분리되는 검체는 호흡기 관련 검체이지만 그밖에도 체액, 조직, 요, 위액, 혈액, 대변 등에서도 분리된다[12]. 이들 중 체액은 정상적으로는 무균 상태여서 결핵균을 배양할 경우, 다른 상재균에 대한 오염율은 낮은 반면, 결핵균이 감염된 체액의 경우, 호흡기 검체에 비해 균의 감염 농도가 낮아 배양하는데 더 오랜 시간이 필요할 뿐만 아니라 검출률도 객담에 비해 낮다[10-12]. 따라서 검출율이 우수한 배양 방법의 선택이 매우 필요하다. 본 연구는 체액에서 24시간 배양 및 검출 감시가 가능한 결핵균 배양용 액체 배지를 사용하는 MGIT 960 system을 이용한 결핵균의 검출 시간과 배양 성적을 기존의 전통적인 고체 배지 방법과 비교하여 체액에서의 액체 배지 사용에 대한 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1999년 1월부터 2002년 9월까지 서울보훈병원 진단검사의학과에 결핵균 배양 검사가 의뢰된 총 1,891 건의 체액 검체에 대하여 항산성 도말 염색과 배양을 실시하였다.

2. 검체 처리

체액은 정상적으로는 오염되지 않은 검체이므로 액체 배지(MGIT, Becton Dickinson, USA)와 고체 배지(3% Ogawa, Eiken, Japan) 사면에 검체의 침사를 직접 접종하였다. 그러나 그람 염색에 균이 검출된 검체는 다음과 같은 전처리 과정을 거친 후 접종하였다.

50ml의 원추형 시험관에 검체와 동량의 2% NaOH 용액(4% NaOH 용액과 2.9% sodium citrate 용액을 동량 섞었음. 최종 농도는 1%)을 넣은 후 혼합하였다. 15분간 실온에 방치 후 0.067M의 인산 완충액(pH 6.8)으로 50ml까지 채워 냉장 원심 분리기의 3,000g에서 15분간 원침하였다. 침사에 1 ml의 인산 완충액을 넣고 항산성 염색과 결핵균 배양을 실시하였다[12].

3. 항산균 염색

침사를 유리 슬라이드에 도말한 후 Ziehl-Neelsen법으

로 항산성 염색을 실시하였다. 200배 시야에서 전 영역을 검색하고 1,000배에서 확인하는 방식으로 10분이상 관찰하여 American Thoracic Society의 기준에 따라 1+이상을 양성으로 판정하였다[13].

4. 결핵균 배양

검체를 3% Ogawa 배지에 접종하여 37에서 배양하였고, 1주에 한번씩 8주동안 균 집락을 관찰하였다. 또한 oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase가 첨가된 OADC (Becton Dickinson, USA)와 polymyxin B 6,000 units, amphotericin B 600 ug, nalidixic acid 2,400 units, trimethoprim 600 ug, azlocillin 600 ug이 포함된 PANTA 용액(Becton Dickinson, USA)을 섞어 그 중 0.8 ml과 검체의 침사 0.5 ml을 modified Middlebrook 7H9 broth base, glycerol, casein peptone과 fluorescent indicator가 첨가된 7ml의 MGIT (Becton Dickinson, USA)에 넣은 후 MGIT 960 system에서 배양하였다. 60분마다 균 성장 유무가 자동으로 검색되며 6주까지 배양 관찰된다. 남은 침사는 혈액 한천 배지에 접종해 다음 날 오염 여부를 관찰하였다. MGIT 960 system에서 균 성장의 양성 경보음이 울리면 배양 중인 MGIT tube를 꺼내 침사로 항산성 염색을 실시하여 결핵균 유무와 잠균 오염 여부를 알아보았다. 또한 중합효소 연쇄반응을 실시하여[14-15] *M. tuberculosis* 유무를 최종 확인하였다. 양성 경보음이 없는 MGIT tube는 기기 내에서 6주간 배양 후 꺼내 모두 항산성 염색을 실시한 후 폐기 처리하였다.

5. 통계 처리

두 배양 방법 간의 분리율에 대한 비교는 SPSS 프로그램(window version 8.0)의 *chi-square test* 검정을 사용하였고, 검출 시간에 대한 비교는 *paired Wilcoxon test* 검정을 사용하였다. 통계적 유의 수준은 *P value* 0.05 이하로 하였다.

결 과

총 1,891 개의 검체 중 62건(3.28%)에서 결핵균(비정형 결핵균 포함)이 검출되었다(Table 1). 검출된 결핵균 중 *Mycobacterium tuberculosis* (이하 *M. tuberculosis*)가 60건(96.8%)이고, 비정형 결핵균은 2건(3.2%)였다. 결핵균이 분리된 62 건 중 액체 배지를 사용하는 MGIT 960 system에서 분리된 수는 56건(90.3%)이고, 고체 배지에서 분리된 수는 33건(53.2%)이었다. 액체 배지와 고체 배지 양쪽에서 모두 분리된 경우는 27건(43.6%)이었다. 결핵균이 액체 배지에서만 분리된 경우는 29건이었고(46.8%), 고체 배지에서만 분리된 경우는 6건(9.7%)으로서 액체배지에서의 검출율이 현저하게 높았다($P < 0.001$) (Table 2).

Table 1. Specimen types and recovery of mycobacteria

Specimens	Tested number	Positive number
CSF	214	4
Pleural fluid	752	33
Ascitic fluid	629	8
Joint fluid	79	1
Peritonzil	54	7
Other*	163	9
Total	1,891	62 (3.28%)

* unknown source.

Table 3. Distribution of isolates recovered in each culture method according to AFB smear

Culture method	No. (%) of isolates	
	AFB smear (+) (N=11)	AFB smear (-) (N=51)
MGIT 960 system	10 (90.9)	46 (90.2)
Ogawa media	8 (72.7)	25 (49.0)

Table 5. Mean time for detection of mycobacteria in AFB smear(+)/smear(-) specimen

Culture method	Average No. of day	
	AFB smear (+) (N=11)	AFB smear (-) (N=51)
MGIT 960	11.1	15.8
Ogawa media	26	41.7

배양에서 결핵균이 분리된 62 건 중에서 항산성 도말 검사에서 양성인 11건(17.7%)이었다. 이들의 배양 결과, 도말 양성되었던 검체는 액체 배지에서 10건 배양되었으나 고체 배지에서는 8건 배양되었다. 도말 음성인 검체 51 건 중 액체 배지에서 46건이 배양되었고, 고체 배지에서는 25건이 배양되었다(Table 3).

MGIT 960 system에서 양성이 나오지 않아 6주간 배양한 검체는 모두 침사를 이용해 항산성 염색을 실시하였으며, 양성 검체는 하나도 발견되지 않았다.

결핵균이 검출되기까지 소요된 평균 검출 시간은 액체 배지를 사용한 MGIT 960 system이 평균 14.2일이었고, 육안으로 관찰한 고체 배지는 38.2일이었($P < 0.0001$). 이 중 *M. tuberculosis*가 검출되는데 걸린 시간은 MGIT 960 system이 평균 14.6일, 고체 배지가 평균 37.8일이었고($P < 0.0001$), 비정형 결핵균일 경우 MGIT 960 system이 평균 8.0일, 고체 배지가 평균 49일 소요되었다($P < 0.0001$)(Table 4). 또한 항산성 도말 염색 결과에 따른 검출 시간의 비교에서 도말 양성 검체는 MGIT 960에서 평균 11.1일, 고체 배지에서 평균 26일이 소요되었고, 도말

Table 2. Distribution of isolates recovered with MGIT system and solid media*

	No.(%) of isolates			
	Total	MGIT	Solid media	Both
<i>M.tuberculosis</i>	60(96.8)	28	6	26
MOTT	2(3.2)	1	0	1
All	62 (100)	29(46.8)	6(9.7)	27(43.6)

* Ogawa media.

Table 4. Mean time for detection of mycobacteria in MGIT 960 system and solid media

Culture method	Average No. of day		
	<i>M. tuberculosis</i> (N=60)	MOTT (N=2)	Both (N=62)
MGIT 960	14.6	8	14.2
Ogawa media	37.8	49	38.2

음성 검체인 경우 MGIT 960에서 평균 15.8일, 고체 배지에서 평균 41.7일이 소요되었다(Table 5). 오염율은 MGIT 960 system에서 4.1% (78/총1891), 고체 배지에서 1.7% (32/총1891)이었다.

고 찰

결핵 환자를 진단하는데 있어서 결핵균 배양 검사는 가장 신뢰할 만한 검사법이다. 그러나 고체 배지를 사용하여 배양할 경우 6주 내지 8주간의 배양 기간을 거쳐야 하므로 환자의 진단 및 치료에 많은 어려움이 있다. 최근에는 좀 더 단축된 배양 기간으로도 검출율을 높일 수 있는 액체 배지의 사용이 추천되고 있다[3].

본 연구는 상재균이 많은 호흡기계 검체와는 달리 상재균은 없으나 감염된 결핵균의 농도가 낮은 체액을 대상으로 MGIT 960 system의 유용성을 분석하고자, 결핵균 배양이 의뢰된 총 1,891건의 체액 검체에 대하여 액체 배지와 기존의 고체 배지를 동시에 사용하여 결핵균 배양을 실시하였다. 62건에서 결핵균이 배양되었는데, 그 중 90.3%(56건)는 액체 배지에서 분리되었고, 53.2%(33건)는 고체 배지에서 분리되어 액체 배지에서 약 1.7배 많이 배양되었다. 호흡기 검체로만 분석한 Ichiyama 등은 분리된 123 건 중 액체 배지인 MGIT system에서 118건(95.9%)이 분리되었고, 고체 배지에서 65건(52.8%)이 분리되었다고 보고하였다[9]. Pfyffer 등은 호흡기 검체가 대다수 포함된 검체에서 분리된 180건 중 MGIT 액체 배지에서 137(76.1%)건이 분리되었고, 고체 배지에서 125(69.4%)건이 분리되었다고 보고하였다[11]. Tortoli 등은 대부분의 호흡기 검체 중 236건에서 결핵균이 분리되었는데, MGIT system에서 190건(80.5%)이, 고체 배지에서 167건

(70.8%)이 분리되었다[16]. 액체 배지와 고체 배지의 차이를 비교한 대부분의 보고들은 결핵균이 많이 검출되는 호흡기 검체와 그 밖의 체액 검체 결과를 합친 통계치를 보고하여 체액에서만 액체 배지 효과를 정확히 알기는 어려웠다. 본 저자의 발표된 결과에 의하면[8], 호흡기 검체가 포함된 전체 검체에서 결핵균이 분리된 전체 건수 중 액체 배지에서 96.1%(174/181), 고체 배지에서 40.3%(73/181) 분리되어 체액에서의 결과가 전체 검체 결과와 크게 다르지 않음을 알 수 있었다.

결핵균이 배양된 시간에 있어서 본 연구 결과, 액체 배지의 MGIT 960 system은 평균 14.2일이 소요되었고, 고체 배지는 평균 38.2일이 소요되어 검출기간이 약 1개월 차이가 났다. MGIT system의 경우 기기에 의한 형광검출의 예민도 증가와 함께, 1시간마다 지속적으로 균의 성장을 감시 및 보고하는 방법으로 운용되기에 균의 성장을 검출하는데 소요되는 시간이 매우 단축되었다. 하지만 고체 배지의 경우, 자동으로 점검하는 기기가 없어서 수작업으로 배지에서 균 집락 유무를 살펴야 하므로, 일주일에 한 번의 빈도로 배지의 균 집락 유무를 확인하였다. Ichiyama 등은 액체 배지에서 평균 16.6일, 고체 배지에서 27.1일을 보고하였다[9]. Pfyffer 등은 액체 배지에서 9.9일, 고체 배지에서 20.2일의 검출 시간을 보고하였다[11]. Tortoli 등은 액체 배지에서 13.3일, 고체 배지에서 25.6일을 보고하였다[16]. 따라서 수작업에 의한 고체 배지 방법에 비해 기기 검출이 가능한 액체 배지를 아용하면 결핵균이 감염된 경우 약 2주일 내외면 결과를 알 수 있을 것으로 사료된다.

체액의 경우 정상적으로 무균 상태이므로 감염균이 있더라도 호흡기 검체에 비해서는 상대적으로 오염율이 매우 낮았다. 본 연구 결과 액체 배지의 경우 4.1%, 고체 배지의 경우 1.7%였다. 체액의 경우, 객담 검체와는 달리 NaOH 처리를 하지 않고 검체를 바로 배지에 접종하기 때문에 검체 내의 소수 감염균 처리 과정에서의 오염 등으로 배지가 오염된 경우는 소수 있었으나 호흡기 검체에 비해서는 매우 낮은 오염율을 보였다[8,10].

이상의 결과에서 체액에서 액체 배지를 사용할 경우, 호흡기 검체에 비해 오염율은 적으면서 감염된 결핵균의 농도가 적음에도 불구하고 검출율은 높일 수 있었고, 검출 시간은 약 한 달 단축할 수 있었다. 수작업으로 균 성장 유무를 감시하는 고체 배지에 비해 재료 비용이 비싸서 모든 검체에서 액체 배지를 모두 사용할 수 없는 경우에는 체액에서 만이라도 액체 배지를 사용한다면 결핵 감염환자의 조기 진단 및 치료에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

배 경 : 결핵에 의한 질환은 세계적으로 유병율이 높아 감염의 예방 및 확산을 방지하기 위해서는 신속한 결

과 보고가 필요하다. 가장 신뢰할 수 있는 결핵 진단 방법은 배양법이나 기존의 고체 배지를 이용할 경우 결과 보고 시간이 매우 오래 걸려 최근에는 액체 배지를 이용한 신속한 방법이 개발되고 있다. 본 연구는 체액에서 액체 배지를 이용한 MGIT 960 system으로 결핵균의 검출율과 검출시간을 기존의 고체 배지법과 비교하였다.

재료 및 방법 : 결핵균 배양이 의뢰된 총 1,891 건의 체액을 대상으로 액체 배지와 고체 배지를 이용해 배양을 실시하였다. 액체 배지인 경우 MGIT 960 system을 이용해 6주동안 배양을 실시하였고, 고체 배지는 8주에서 8주간 배양하였다. 자란 균은 항산성 염색과 중합효소 연쇄반응을 실시해 *Mycobacterium tuberculosis*와 MOTT를 구별하였다.

결 과 : 총 1,891 건 중 62건(3.28%)에서 결핵균(비정형 결핵균 포함)이 검출되었다. 검출된 결핵균 중 *M. tuberculosis*가 60건(96.8%)이고, 비정형 결핵균은 2건(3.2%)였다. 결핵균이 분리된 62 건 중 액체 배지에서 분리된 수는 56건(90.3%)이고, 고체 배지에서 분리된 수는 33건(53.23%)이었다. 액체 배지와 고체 배지 양쪽에서 모두 분리된 경우는 27건(43.6%)이었다. 액체 배지에서만 분리된 경우는 29건이었고(46.8%), 고체 배지에서만 분리된 경우는 6건(9.7%)이었다. 결핵균이 분리된 62 건 중에서 배양 전 실시한 항산성 도말 검사에서 양성인 11건(17.7%)이었고, 이들 중 액체 배지에서 10건 배양되었으나 고체 배지에서는 8건 배양되었다. 도말 음성인 검체 51 건 중 액체 배지에서 46건이 배양되었고, 고체 배지에서는 25건이 배양되었다. 평균 검출 시간은 MGIT 960 system이 평균 14.2일이었고, 고체 배지는 38.2일이었다 ($P < 0.0001$). 오염율은 MGIT 960 system 4.1%, 고체 배지 1.7%였다.

결 론 : 체액에서의 결핵균 검출에 MGIT 960 system을 이용한 액체 배지 배양법은 기존의 고체 배지법에 비해 검출률도 우수할 뿐만 아니라 검출 시간도 매우 단축되었다. 따라서 결핵에 대한 유병율이 높은 우리나라의 경우, 액체 배지를 이용한 결핵균 배양법은 결핵 환자의 관리에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Heifets LB. *The mycobacteriology laboratory. Past, present and future. Clin Lab Med* 1996;16:513-25.
2. Dixie E Snider Jr, Mario Raviglione, Arata Kochi. *Global burden of tuberculosis. In: Barry R Bloom, ed. Tuberculosis. Washington DC: ASM press, 1994:3-11.*
3. Centers for Disease Control and Prevention: *CDC guidelines for tuberculosis control in health care facilities. Morbid Mortal Weekly Rep* 1994;43:1-13.
4. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. *The resurgence of tuberculosis: Is*

- your laboratory ready? J Clin Microbiol* 1993;31:767-70.
5. 최윤미, 배직현. BACTEC system을 이용한 mycobacteria 검사. 대한임상병리학회지 춘계초록집. 1991;11:271.
 6. 이경인. 임상 검체에서 결핵균 검출을 위한 BACTEC 460 TB의 유용성. 대한임상병리학회지 1997; 17:89-98.
 7. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid fast smear positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:689-96.
 8. 최윤미, 이명희. 결핵균 배양기기 BACTEC MGIT 960 System의 평가. 대한임상병리학회 2000;20:56-61.
 9. Ichiyama S, Iinuma Y, Yamori S, Hasegawa Y, Shimokata K, Nakashima N. *Mycobacterium* growth indicator tube testing in conjunction with the accuprobe or the amplicor-PCR assay for detecting and identifying mycobacteria from sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2022-5.
 10. Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Bojak M, Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and BACTEC 460 culture systems. *J Clin Microbiol* 1997;35:2068-71.
 11. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J et al. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with radiometric and solid culture for recovery of acid fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35:364-8.
 12. Notle FS, Metchock B. Mycobacterium. In Murray PR, Baron EJ et al. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM press, 1995:400-37.
 13. American thoracic society. *Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial disease*. *Am Rev Respir Dis* 1990;123:343-58.
 14. McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty S, van Embden JDA et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 1990; 4:1607-13.
 15. 최윤미, 이명희. 객담에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵균 검출법의 평가. 대한임상미생물학회지 1999;2:144-51.
 16. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of Mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999;37:3578-82.
 17. Bouyer NW, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000;38:4167-70.