

Mycobacterium Growth Indicator Tube와 오가와 배지에서의 Mycobacteria 배양성적에 대한 비교

정의석, 정윤성, 이선호, 김성률

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 진단검사의학교실

Comparison of Mycobacterial Culture by Mycobacterium Growth Indicator Tube and Ogawa Media

Ue Suk Joung, Joseph Jeong, Seon Ho Lee, Sung-Ryul Kim

Department of Laboratory Medicine, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine, Ulsan, Korea

Background : Mycobacterial disease is still greatly concerned in the developing and industrialized countries. Ogawa media has been used to diagnose mycobacterial disease in Korea in spite of a low sensitivity and long incubation time. Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 system has been developed to overcome the pitfalls of Ogawa media. So, we investigated improvement in detection rate and the detection time of mycobacteria using the MGIT 960 system along with 3% Ogawa media.

Methods : A total of 8,045 clinical specimens referred to the department of laboratory medicine in Ulsan University Hospital from January in 2001 to June in 2002 were cultured for mycobacteria. Specimens were processed with the NALC-NAOH (final concentration of NaOH: 1%) and inoculated into both MGIT and Ogawa media. Mycolic acid in the cultured products were analyzed by High performance liquid chromatography to discriminate between *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria.

Results : Of 8,045 clinical specimens cultured, mycobacteria grew in 957 (11.9%) specimens, 840 (87.8%) *M. tuberculosis* and 117 (12.2%) nontuberculous mycobacteria. Mycobacteria were detected in 939 specimens (98.1%) by MGIT and 771 (80.6%) specimens by Ogawa media; 753 (78.7%) were detected by both media, 186 (19.4%) by MGIT only, and 18 (1.9%) by Ogawa media only. Mycobacteria were detected in 11.7 days by MGIT 960 and 28.4 days by Ogawa media.

Conclusions : The detection rate and detection time of mycobacteri are improved considerably by the MGIT system; however a combined use of MGIT system and Ogawa media is the most ideally recommended for increasing the detection rate and shortening the detection time..

(*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(2):135-138)

Key words : Mycobacteria, Mycobacterium Growth Indicator Tube 960 system, 3% Ogawa

서 론

접 수 일: 04/8/9 게재승인일: 04/8/26

교신저자: 김성률

(682-714) 울산광역시 동구 전하1동 290-3번지

울산의대 울산대학교병원 진단검사의학교실

TEL : 052)250-7271 FAX : 052)250-8269

E-mail : srkimuuh@hitel.net

결핵 및 mycobacteria 감염성 질환들을 정확하고 신속하게 진단하고 치료하기 위해서는 mycobacteria의 빠른 검출이 필요하다[1]. 그러나 대부분의 국내 3차 의료기관들은 전통적인 고체배지 배양법만을 사용하고 있으며

[2], 최근 보고에 의하면 전체 의료기관들의 90%에서 여전히 고체배지 배양법만을 사용하고 있다[3].

전통적인 고체배지 배양법은 비용이 저렴하고 오염과 혼합감염을 신속하게 발견하므로 여전히 mycobacteria 배양에 널리 사용되고 있지만, 검출 소요시간이 6주 정도로 오래 걸리는 단점이 있다. 이에 비하여 액체배지 배양법은 상대적으로 검출률이 더 높고 보다 신속하게 결과를 얻을 수 있다[4-8].

이에 본 연구에서는 mycobacteria 배양에 있어서 의뢰된 임상검체를 전통적 고체배지인 3% Ogawa 배지(Asan, Korea) 외에 액체배지인 Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT, Becton Dickinson, Sparks, Md., USA)에 추가로 접종하였을 경우에 예측되는 검출률의 증가와 검출 소요시간의 단축을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년 1월 1일부터 2002년 6월 20일까지 울산대학교 병원 진단검사의학과에 mycobacteria균 배양검사가 의뢰된 3,072 명의 8,045 검체에서 mycobacteria가 배양된 448 명의 957 검체를 대상으로 분석하였다.

2. 검체의 전처리와 접종

배양검사가 의뢰된 검체들 중에서 객담과 같이 점액이 섞여 육안상으로 혼탁한 검체들은 NALC-NaOH 방법으로 오염균을 제거하고 액화시켰다[9,10]. 비점액성 검체는 전처리 과정을 생략한 채 곧바로 Ogawa 배지와 MGIT에 접종하였다. 전처리된 검체는 50 mL Falcon Polypropylene 원추형 시험관에 넣어 4°C에서 3,000 g로 15분간 원심분리한 후 상층액은 조심스럽게 버리고 남은 침전물에 1-3 mL의 phosphate buffered saline (PBS)을 첨가하여 혼합시킨 용액을 만들었다. 액체배지인 MGIT의 경우 전처리된 검체 0.5 mL를 항균제 혼합액 0.8 mL와 함께 접종하였다. 이때 사용한 항균제 혼합액은 polymyxin B 6,000 units, amphotericin B 600 µg, nalidixic acid 2,400 units, trimethoprim 600 µg, azlocillin 600 µg이 포함된 BBL MGIT PANTA 혼합액(Becton Dickinson) 1 vial에 결핵균 성장을 위한 bovine albumin, catalase, dextrose, oleic acid가 포함된 BBL MGIT OADC enrichment (Becton Dickinson) 10.5 mL를 첨가 혼합하여 제조하였다.

3. 배양 및 결핵균의 동정

고체배지인 Ogawa 배지는 배지의 마개를 느슨하게 열어 실내공기 압소에서 37°C 항온기에 사면으로 눕혀서 24시간 동안 배양한 후 다시 마개를 닫고 8주까지 배양하

였다. 배지는 3일에 한 번씩 육안 관찰하여 집락이 1개 이상 보이면 Ziehl-Neelson 염색을 통해 균의 유무를 확인하였으며, 결핵균을 검출하는데 소요되는 시간은 배지 표면에 집락이 관찰되는 첫 날을 기준일로 정하였다. Ogawa 배지에서 세균 집락이 결핵균의 성장을 분별할 수 없을 정도로 많이 증식되었을 때나, 배지의 사면이 완전히 내려앉았을 경우에는 오염으로 간주하였다. MGIT 액체배지에서는 검체를 접종한 후 MGIT 960 system에서 6주간 배양하였다. MGIT 960 system에서 균 성장의 양성 경보음이 울리면 배양 중인 MGIT를 꺼내 침사로 Ziehl-Neelson 염색을 실시하여 항산균 유무와 잠균 오염여부를 알아보았다. Mycobacteria를 검출하는데 소요되는 시간은 MGIT 960 system에서 MGIT가 양성으로 확인된 날을 기준일로 하였다.

균종의 동정은 HPLC (Waters, Milford, USA)에서 관찰되는 mycolic acid에 대한 chromatographic pattern에 따랐다. HPLC에는 Reverse phase analytical cartridge column, 3.9×75 mm, packed with 3 µm silica (Nova-Pak C18) column (Waters)을 사용하였고, 정도판리는 mycobacteria 표준균주 33 종(총 50균주)을 사용하였다.

결 과

2001년 1월 1일부터 2002년 6월 20일까지 울산대학교 병원 진단검사의학과에서 mycobacteria 검출을 위하여 배양검사를 실시한 총 8,045개의 검체들 중에서 957 검체에서 mycobacteria가 배양되어 11.9%의 검출률을 보였다. 검출된 mycobacteria 중에서 *Mycobacterium tuberculosis*가 840 검체(87.8%)이었으며, nontuberculous mycobacteria (NTM)가 117 검체(12.2%)였다. Mycobacteria가 분리된 957 검체들 중에서 MGIT 960 system에서 939 검체(98.1%)가 배양되었으며, Ogawa 배지에서 771 검체(80.6%)가 배양되었고, 양쪽에서 모두 배양된 경우가 753 검체(78.7%)이었으며, MGIT 960 system에서만 배양된 경우는 186 검체(19.4%)이고, Ogawa 배지에서만 배양된 경우는 18 검체(1.9%)였다(Fig. 1).

Mycobacteria가 검출되기까지 소요된 시간은 MGIT 960 system에서 평균 11.7일(1.0~39.0일)이었고, Ogawa 배지에서는 평균 28.4일(7.0~56.0일)이었다. 이 중 *M. tuberculosis*가 검출되는데 소요된 시간은 MGIT 960 system에서 평균 12.0일이었고, Ogawa 배지에서는 평균 28.5일이었다. NTM의 경우에는 MGIT 960 system에서 평균 10.0일이었고, Ogawa 배지에서는 평균 27.9일 소요되었다(Table 1).

고 찰

국내 통계에 따르면 결핵균은 항산성 염색검사법으로 24시간 이내에 검출 결과가 보고되지만, 균의 분리와 동

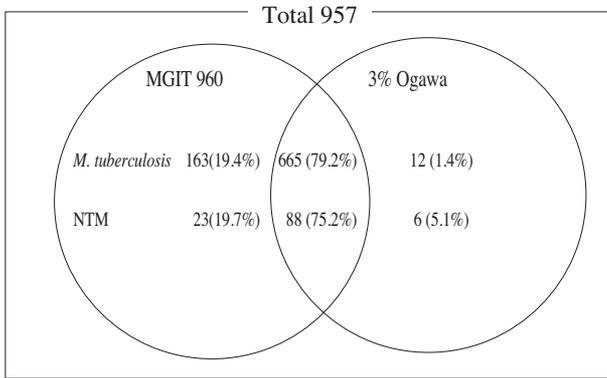


Fig. 1. Number of mycobacterial isolates recovered in a MGIT 960 system and 3% Ogawa media. Abbreviations: MGIT, Mycobacterium Growth Indicator Tube; NTM, nontuberculous mycobacteria.

정에는 약 6주가 소요되고, 결핵 연구원에 의뢰되는 항균제 감수성 검사까지 포함시키면 모두 합쳐서 8-10주가 소요되는 것으로 집계되었다[2]. 따라서 결핵균 배양에 있어 장시간 소요되는 기존의 고체배지법만을 고수하기 보다는 보다 더 신속한 배양 방법의 도입이 필요하다. 근래에 개발된 액체배지 배양 방법 중 하나인 MGIT 960은 배양 기간 동안에 균의 성장을 형광 감지기를 통하여 연속적으로 감시하는 자동화 장비로서 기존의 고체배지법 보다 더욱 민감하고 신속하게 mycobacteria를 검출할 수 있다.

본 연구에서는 8,045 검체를 대상으로 MGIT 960과 Ogawa 고체배지에서 동시에 항산균 배양검사를 실시한 결과, 957 검체(11.9%)에서 mycobacteria가 배양되었다. 배양된 검체들은 939 검체(98.1%)에서 MGIT 960법으로 분리되었고 771 검체(80.6%)에서 고체배지법으로 분리되어, 액체배지법인 MGIT 960에서 고체배지에서보다 168 검체(17.6%)가 더 많이 검출되었다. 또한 MGIT 960만으로 배양하여도 고체배지에서 검출되지 않았던 186 검체(19.4%)들이 더 검출되었다. 결핵균 배양에 따른 mycobacteria 검출률은 Hanna 등[4-7]은 MGIT 960과 Ogawa 고체배지에서 각각 76.9-96.1%, 40.3-69%로 보고하였으며, Chew 등[11]은 4주 이내의 배양에 의한 mycobacteria 검출률에서 MGIT 960과 Lowenstein-Jensen 고체배지에서 각각 61%, 66%로 보고하였다. 본 연구에서는 MGIT 960과 고체배지법에서 이들 연구자들 보다 각각 2.0-21.2%, 11.6-40.3% 더 높은 검출률을 보였으므로 본 연구에서 더 우수한 결과를 보였다. 또한 Hanna 등[4,5]은 MGIT 960에서 고체배지와 병행하여 배양하였을 때에는 고체배지만 단독으로 배양하였을 때보다 7-13% 정도 더 높게 검출되었지만, 본 연구에서는 19.4% 더 많이 검출되었으므로 본 연구에서 상대적으로 더 우수한 액체배지 검출률을 보였다.

Mycobacteria 검출소요시간은 결핵균 배양 시스템의

Table 1. Duration of time (days) to detect of mycobacteria in MGIT 960 system and 3% Ogawa media

Culture system	days to detection (range)		
	<i>M. tuberculosis</i>	NTM	Total
MGIT 960	12.0 (6~38)	10.0 (1~39)	11.7 (1~39)
3% Ogawa	28.5 (14~56)	27.9 (7~56)	28.4 (7~56)

Abbreviations: MGIT, Mycobacterium Growth Indicator Tube; NTM, nontuberculous mycobacteria.

평가에 있어 중요한 지표 중 하나이다. Hanna 등[4, 6-8]은 검출소요시간이 MGIT 960과 Ogawa 고체배지에서 각각 9.3-14.4일, 21.6-31.6로 보고하였으며, 본 연구에서도 mycobacteria 검출소요시간은 MGIT 960에서 평균 11.7일, Ogawa 배지에서 평균 28.4일로서 액체배지에서 고체배지에서보다 의미있게 더 짧았다($P < 0.05$).

Mycobacteria의 검출에서 오염이 문제가 되고 있으며, 특히 액체배지에서 오염이 더 많이 보고되고 있다. 오염율은 MGIT 960에서 Kanchana 등[7,8]은 6.4-14.9%로 보고하였으며, Ogawa 배지에서 최 등[8]은 2.6%로 보고하였다. 액체배지를 사용하는 MGIT 960에서는 glycerol과 dextrose를 포함한 영양 성분이 배지 내에 풍부하므로 비항산성균인 오염균이 성장 증가하기에 유리한 조건이며 [12], 검체 내에서 존재하다가 오염 제거 과정에서 PANTA 등의 항생제에 살아남은 내성균으로도 오염될 수도 있는데[13], 항생제 조합을 PANTA에서 vancomycin, amphotericin B, nalidixic acid으로 교체하여 검출률과 검출 시간의 차이 없이 오염율을 10.7%에서 5.4%로 줄일 수 있었다는 보고도 있다[14].

결론적으로 mycobacteria 배양에서 Ogawa 배지에 MGIT 960을 추가로 병행 사용하면, 검출률이 19.4% 증가하고, 검출소요시간도 16.7일이 단축되었다. 고체 배지는 비용이 저렴하고, 오염 및 혼합감염을 발견하고, 집락 형태를 관찰할 수 있으며, 고체배지에서만 자라는 mycobacteria를 검출하고, 액체배지만으로 모든 mycobacteria를 검출할 수 없는 문제점들을 해결할 뿐만 아니라 액체배지 사용에 따른 높은 오염율과 계대배양의 필요성 등의 단점[15]들도 해결할 수 있어 여전히 중요한 역할을 하고 있다[13]. 그러므로 mycobacteria 검출에 있어 액체배지만 단독 사용하기 보다는 고체배지와 액체배지를 병행 사용하는 것이 가장 적절하다고 판단된다. 하지만 고체배지와 액체배지를 병행 사용하려면 시간과 인력이 많이 필요하므로 비용적인 측면에서 한 가지 만 사용할 경우에는 검출률과 검출소요시간의 성적이 더 우수한 액체배지를 사용하는 것이 나을 것으로 판단된다.

요 약

배 경 : 결핵 및 mycobacteria 감염성 질환의 원인균들을 배양하기 위하여 3% Ogawa 배지가 여전히 사용되

어 신속 정확한 진단에 부족하였으나, 최근에는 이러한 단점들을 해소하기 위하여 액체배지를 이용한 MGIT 960 system이 개발되었다. 이에 본 연구자들은 전통적인 Ogawa 배지 배양법에 MGIT 960 system을 추가하면 mycobacteria에 대한 검출률과 검출소요시간에 도움이 되는지 판단하고자 하여 본 연구를 하였다.

방 법 : 2001년 1월 1일부터 2002년 6월 20일까지 본 병원 진단검사의학과에 의뢰된 총 8,045 검체를 대상으로 결핵균을 검출하였다. 의뢰된 검체는 NALC-NaOH 방법으로 처리한 다음 액체배지와 고체배지에 배양을 실시하였고, 배양된 검체들은 HPLC 검사법으로 분석한 mycolic acid의 유형에 따라 동정하였다.

결 과 : 2001년 1월 1일부터 2002년 6월 20일까지 울산대학교병원 진단검사의학과에서 mycobacteria 배양검사를 실시한 총 8,045개의 검체들 중에서 957 검체(11.9%)에서 mycobacteria가 검출되었으며, 이 중에서 *M. tuberculosis*가 840 검체(87.8%)에서 검출되었으며, non-tuberculous mycobacteria(NTM)가 117 검체(12.2%)에서 검출되었다. Mycobacteria는 MGIT 960 system에서 939 검체(98.1%), Ogawa 배지에서 771 검체(80.6%), 양쪽에서 753검체(78.7%), MGIT 960 system 단독으로 186 검체(19.4%)이고, Ogawa 배지 단독으로 18 검체(1.9%)에서 배양되었다. Mycobacteria 검출 소요시간은 MGIT 960 system에서 평균 11.7일(1.0~39.0일), Ogawa 배지에서 평균 28.4일(7.0~56.0일)이었다. 이 중 *M. tuberculosis*는 MGIT 960 system에서 평균 12.0일, Ogawa 배지에서 평균 28.5일 소요되었으며, NTM은 MGIT 960 system에서 평균 10.0일, Ogawa 배지에서 평균 27.9일 소요되었다.

결 론 : MGIT 960을 이용한 결핵균 배양 및 검출법은 고체배지에 비해 검출률과 검출소요시간에서 우수한 결과를 보였다. Mycobacteria 배양에서 빈도는 낮지만 고체배지에서만 배양된 경우들도 있으므로 액체배지와 고체배지를 병용하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 그러나 한 가지만 사용할 경우라면 검출률과 검출소요시간이 우수한 액체배지를 사용하는 것이 나을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin Infect Dis* 2001;33:834-46.
- 김미나, 이선화, 양성은, 배직현. 국내 3차 및 대학병원에서의 결핵균 검사 실태조사. *대한임상병리학회지* 1999;19:86-91.
- 장철훈, 박태성, 김미나, 이남용, 이희주, 서진태. 국내 결핵균 검사 기관의 검사 실태의 변화. *대한임상미생물학회지* 2001;4:108-14.
- Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999;37:748-52.
- Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer RL. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:2236-9.
- 이지연, 김중필, 신중희, 서순팔, 양동욱. BACTEC MGIT 960 System을 이용한 결핵균의 검출 - BACTEC 460 TB system 및 Ogawa 배지와 비교. *대한임상병리학회지* 2000;20:384-91.
- Kanchana MV, Cheke D, Natyshak I, Connor B, Warner A, Martin T. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for the recovery of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:31-6.
- 최윤미 및 이명희. 결핵균 배양기기 BACTEC MGIT 960 System의 평가. *대한임상병리학회지* 2000;20:56-61.
- Krasnow I and Wayne LG. Sputum digestion I The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Tech Bull Regist Med Technol.* 1966;36:34-7.
- Krasnow I and Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Appl Microbiol* 1969;18:915-7.
- Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of *Mycobacterium* species. *J Med Microbiol* 1998;47:821-7.
- Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM, Baker JF, et al. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. *J Clin Microbiol* 1991;29:154-7.
- 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.
- Chang CL, Park TS, Oh SH, Kim HH, Lee EY, Son HC, et al. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination. *J Clin Microbiol* 2002;40:3845-7.
- Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Mycobacterium: General characteristics, isolation, and staining procedures. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, eds. *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed. Washington DC:ASM Press, 2003:532-59.