

마이코박테리아의 자동형광염색기 AT-2000F의 유용성 평가

김신영¹, 양은경¹, 김영진¹, 이선민¹, 이은엽¹, 박영길², 배길한², 장철훈^{1,2}

부산대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실¹, 대한결핵협회 결핵연구원²

배 경 : 객담 도말 검사는 경제적이고 신속하며, 전염력이 있는 폐결핵 환자를 찾아낼 수 있으나 업무량이 많다. 그래서 검사자의 업무량을 감소시키고, 일정한 염색성을 유지하기 위한 방법으로 개발된 자동염색기의 염색성과 편의성에 대해서 평가하여 보고자 하였다.

방 법 : 부산대학교병원 진단검사의학과 임상미생물검사실로 항산균 염색과 배양이 의뢰된 객담 검체 중 양성이 많이 포함된 100개의 검체를 항산균 자동 염색기인 AT-2000F (Dagatron, 일산, 대한민국)를 이용한 형광염색을 수기로 실시한 형광염색, 그리고 Ziehl-Neelsen 염색과 비교 검토하였다.

결 과 : 자동 형광염색과 수기 형광염색은 100개의 검체 중 98개의 검체에서 결과가 일치하였다. 상이한 결과를 보인 예는 모두 자동 형광염색결과의 1+ 또는 +/-에 비하여 수기 형광염색결과가 +/- 또는 -로, 한 단계 낮은 값으로 보고되었다. 자동 형광염색과 Ziehl-Neelsen 염색은 100개의 검체 중 88개의 검체에서 결과가 일치하였다. 불일치를 보인 12검체 모두 자동 염색에서의 관찰 결과가 수기 Ziehl-Neelsen 염색에서 보인 결과보다 한 단계 높았다. 자동 형광염색기 AT-2000F는 도말된 슬라이드의 착탈을 제외하고는 모두 자동으로 이루어지고, 수기 형광염색에 비해 소요시간이 반으로 줄었고, 슬라이드 간 또는 일간 변화가 적게 관찰되었고 일정한 염색성이 유지되어 판독이 용이하였다.

결 론 : 자동 형광염색기 AF-2000F를 이용한 자동 형광염색은 염색시간의 단축, 업무량의 감소, 동일한 형광 염색성의 유지라는 장점을 가지면서, 수기법에 비해 동일하거나 우수한 염색 결과를 보였다.

서 론

결핵의 진단은 임상 양상, 방사선학적 소견, 결핵균 배양, 객담 도말 검사, 분자생물학적 방법, 면역학적 방법을 통하여 이루어진다[1,2]. 그 중에서도 객담 도말 검사는 경제적이고 신속하며, 전염력이 있는 폐결핵 환자를 찾아낼 수 있는 장점이 있어서 아직까지 이를 대치할 만한 검사가 없는 유용한 검사이다. 객담 도말 검사는 환자로부터 얻어진 객담을 슬라이드에 도말하여 염색한 뒤에 현미경에서 항산균을 관찰하는 검사로, carbolfuchsin을 이용한 Ziehl-Neelsen 염색과 형광을 띠는 auramine을 이용한 fluorochrome 염색이 널리 쓰이고 있다[2]. 광학현미경에서 관찰하는 Ziehl-Neelsen 염색법은 1000배 시야에

서 관찰해야 하기 때문에 슬라이드를 판독하는데 시간이 많이 걸리고, 판독자의 업무량이 많다[3,4]. Auramine을 이용한 형광 염색은 형광현미경을 이용하여 400배 시야에서 관찰하기 때문에 슬라이드를 판독하는데 소요되는 시간이 짧다. 항산균 염색은 염색하는 과정이 여러 단계이고, 검사자간의 차이, 일간 변동 등 여러가지 변수가 있으므로 염색성이 항상 같은 정도로 유지되지 않는다. 또한 염색이 진행되는 동안 검사자가 여러 과정을 처리하기 위해 계속 작업에 참여하여야 한다. 그래서 검사자의 업무량을 감소시키고, 일정한 염색성을 유지하기 위한 방법으로 자동염색기가 고안되어 보급되고 있다. 본 연구에서는 항산균 자동 염색기인 AT-2000F (Dagatron, 일산, 대한민국)을 이용한 항산균 염색과 수기 염색을 비교하여 AT-2000F의 염색성과 편의성에 대해서 평가하여 보고자 하였다.

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년) 지원에 의하여 연구되었음.

접 수 일: 06 / 8 / 17 게재승인일: 06 / 9 / 20

교신저자: 장철훈

(602-739) 부산시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실

TEL: (051)240-7417 FAX: (051)247-6560

E-mail: CCHL@pusan.ac.kr

대상 및 방법

검체의 선택

부산대학교병원 진단검사의학과 임상미생물검사실로 항산균 염색과 배양이 의뢰된 객담 검체 중 100개의 검체를 실험과 관계없는 제3자로 하여금 선택하게 하였다. 검체 선택의 조건은 검사가 의뢰된 날 항산균 염색 결과가 보고된 후 남아있는 검체를 이용하여, 양성인 검체가 많이 포함되도록 양성인 검체를 포함하여 7-8개의 검체를 선택하여 3장의 슬라이드에 도말하였다. 선택된 검체의 검사 결과는 실험자에게 알리지 않았다. 도말 슬라이드는 공기중에서 말린 후 90℃에서 1시간 동안 가열로 고정하였다.

염색

고정 후 3장의 슬라이드는 각각 AT-2000F를 이용한 자동 형광염색법, 수기 형광염색법, 수기 Ziehl-Neelsen 염색법으로 염색을 실시하였다. 염색 시약은 자동 형광염색과 수기 형광염색 모두에 Dagatron사에서 공급하는 시약을 사용하였으며, Ziehl-Neelsen 염색은 carbolfuchsin 시약(영동제약, 용인, 대한민국)을 이용하였다. 자동 형광염색은 한번에 10개의 슬라이드를 올릴 수 있는 슬라이드 장착 장치를 이용해서 제조사에서 처음 지정한대로 AT-2000F의 염색시간을 설정하여 자동 형광염색기에서 1회 10장의 슬라이드를 염색하는데 총 8분 40초가 걸리도록 설정하였다. 수기 형광염색은 자동 형광염색에 사용된 것과 같은 시약을 이용하여 1회에 10개의 슬라이드를 동시에 염색하였으며 auramine/rhodamine 염색 15분을 비롯하여 22분이 소요되었다[5]. Ziehl-Neelsen 염색은 한번에 10개의 슬라이드를 염색하여, 가열 1분을 포함한 carbolfuchsin 염색 6분을 비롯하여 총 12분이 소요되었다[5]. 같은 검체에서 나온 슬라이드는 같은 날 같은 장소에서 염색을 실시하였다.

판독

자동 형광염색, 수기 형광염색, Ziehl-Neelsen 염색은 모두 한 명의 실험자가 판독하였다. 모든 슬라이드는 염색이 이루어진 직후 가능한 한 빨리 판독되었다. 형광염색 슬라이드는 형광현미경(Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 400배 시야에서 판독되었다. Ziehl-Neelsen 염색은 광학현미경(Axioskop 40, Carl Zeiss)으로 1000배 시야에서 판독하였다. 판독 및 결과의 표시는 세계보건기구 보고기준을 따랐다[2,6].

염색 결과의 분석

염색에 사용된 모든 객담 검체는 접수된 당일, 한 검체를 제외하고는 모두 항산균 배양이 동시에 의뢰된 검체로, 배양은 계란을 이용한 고체배지로 실시하였으며, 최종 배양 결과를 확인한 후 배양 결과가 양성일 경우

internal transcribed spacer (IRS)-PCR을 이용하여 동정하였다[7,8]. AT-2000F를 이용한 자동 형광염색과 수기 형광염색 보고 결과의 상관관계, 자동 형광염색과 Ziehl-Neelsen 염색 보고 결과의 상관관계를 스피어만 상관관계 계수를 구하여 비교하였다. 염색성 및 사용의 편의성에 대해서는 주관적인 평가를 실시하였다.

결 과

3가지 염색 방법으로 실시한 염색의 결과는 Table 1과 같다. 자동 형광염색과 수기 형광염색은 100개의 검체 중 98개의 검체에서 결과가 일치하였다. 상이한 결과를 보인 2개의 검체는 자동 형광염색 결과 양성(1+) 또는 불확실(+/-)에 비하여 수기 형광염색 결과가 불확실(+/-) 또는 음성으로 한 단계 낮은 값으로 보고되었고, 두 검체의 배양 결과는 모두 양성이었다. 자동 형광염색과 Ziehl-Neelsen 염색은 100개의 검체 중 88개의 검체에서 결과가 일치하였다. 불일치를 보인 12검체 중 6예는 자동 염색에서 불확실(+/-), Ziehl-Neelsen 염색에서 음성이었는데, 이들의 배양 결과는 배양 양성 2검체, 배양 음성 2검체, 오염 1검체였으며, 1검체는 배양을 실시하지 않았다. 나머지 6예는 모두 자동 염색에서 3+, 2+ 또는 1+로 관찰된 것이 수기 Ziehl-Neelsen 염색에서 한 단계 낮은 2+, 1+ 또는 +/-로 관찰되었고, 배양 결과 배양 양성 4검체, 배양 음성 2검체였다. 자동 형광염색과 수기 형광염색 결과의 스피어만 상관관계수는 0.981이었고, 자동 형광염색과 수기 Ziehl-Neelsen 염색 결과의 스피어만 상관관계수는 0.922로 자동 형광염색은 수기 형광염색과 Ziehl-Neelsen 염색 모두와 의미있는 상관성을 보였다.

편의성의 측면에서 보면, 자동 형광염색기 AT-2000F는 도말된 슬라이드의 착탈을 제외하고는 모두 자동으로 이루어졌으며, 10분 이내의 시간이 소요되어 수기 형광

Table 1. Comparison of the results performed by three different staining methods

Fluorescent stain		Ziehl-Neelsen	No. of
Automated	Manual	stain	cases
—	—	—	74
±	—	—	1
±	±	—	5
±	±	±	5
1+	±	±	1
1+	1+	±	1
1+	1+	1+	3
2+	2+	1+	3
2+	2+	2+	3
3+	3+	2+	1
3+	3+	3+	3

염색보다 약 10분(2배) 정도 빠른 속도를 보였다. 형광염색의 염색성은 자동 형광염색기의 염색성이 수기 형광염색에 비해 슬라이드간 또는 일간 변화가 적게 관찰되었고 일정한 염색성이 유지되어 판독이 용이하였다. 특히, 배경의 어두운 상태는 수기 형광염색에 비하여 높은 일관성을 유지하였다.

고 찰

자동형광염색기 AT-2000F는 초기 개발 모델[9]을 개량한 것으로, 한 번에 최대 10개의 슬라이드를 염색할 수 있으며, 염색의 상태에 따라 염색의 각 단계의 시간을 조절할 수 있다. 슬라이드는 회전판 위에 장착하고, 각 슬라이드의 사이가 떨어져 있어서 염색 도중 교차오염을 방지할 수 있다. 총 다섯 개의 노즐이 슬라이드에 시약을 분사하는데, 슬라이드가 수평으로 놓여져 있어서 시약이 점적되는 형태를 유지하므로 시약의 분사 압력으로 도말 표면에서 검체가 떨어져나갈 위험이 없다. 객담을 도말한 슬라이드를 장착하고 시작 단추를 누르면 염색, 탈색, 세척, 탈수, 건조까지 자동으로 이루어지고 바로 슬라이드를 꺼내어 판독할 수 있다.

본 실험에서 수기 형광염색과 비교하여 본 AF-2000F를 이용한 자동 형광염색은 기존의 수기 형광염색 및 Ziehl-Neelsen 염색과 높은 일치율을 보였다. 불일치한 경우는 모두 자동 형광염색법이 수기 형광염색 또는 수기 Ziehl-Neelsen 염색보다 한단계 높은 결과를 보였다. 한 연구에서 3명의 검사자가 동일한 환자로부터 나온 검체를 동일한 방법으로 처리하여 판독한 결과, 어느 한 명이 불확실(+/-)로 판독하였을 경우 다른 검사자가 그와 다른 결과를 낼 확률이 88%에 이른다고 하였다[10]. 이와 같은 연구 결과를 참고하여 어느 한 방법으로 불확실의 결과가 나온 검체의 결과를 제외하여 고려하면 다음과 같은 해석이 가능하다. 즉, 형광염색 간에는 수기 혹은 자동 염색 사이에 차이가 없고, 자동 형광염색과 Ziehl-Neelsen 염색 모두에서 1+ 이상의 결과를 보인 양성 검체의 약 30%(4/13)에서 형광염색의 관찰 군수가 Ziehl-Neelsen 염색의 관찰 군수보다 한 단계 높았다. 이는 기존의 연구 결과 형광 염색이 Ziehl-Neelsen 염색보다 일관성있게 높은 민감도를 보인다는 사실과도 부합한다[11]. 또한, 편의성을 고려하여 볼 때, 10개의 슬라이드를 평균 10분 이내에 모두 염색할 수 있어 염색 시간을 단축할 수 있고, 슬라이드의 착탈 과정을 제외한 과정이 모두 자동으로 이루어지기 때문에 업무량의 감소를 가져오는 것으로 판단되었다. 그리고, 수기염색에 비해 고른 염색성을 보여 주어 판독하기에 더욱 용이하였다. 한 가지 단점은 한 번에 최대 10개의 슬라이드만을 염색할 수 있기 때문에, 검체 수가 많은 경우에 처리가 가능한 어떠한 대안이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 매일 적절한 수의 검체를 처리하면서 수

기 형광염색 혹은 수기 Ziehl-Neelsen 염색을 실시하는 기관에서는 자동 형광염색기 AF-2000F를 이용한 자동 형광염색으로 대체할 경우, 염색시간의 단축, 업무량의 감소, 동일한 형광 염색성의 유지라는 장점을 가지면서, 수기법에 비해 동일하거나 우수한 염색 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kim SJ. Dagnosis of tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 1998;45:675-86.
2. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II. Microscopy. Geneva; World Health Organization, 1998:1-61.
3. Bishop PJ and Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970;51:196-206.
4. Roberts GD. Bacteriology and bacteriologic diagnosis of tuberculosis. In: Schlossberg D, ed. *Tuberculosis*. 3rd ed. New York; Springer-Verlag, 1994:51-61.
5. Mycobacteria. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, eds. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed, St. Louis; Mosby, Inc., 2002:538-71.
6. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This Official Statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was Adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This Statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
7. Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, et al. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2005;43:1782-8.
8. Park H, Jang H, Kim C, Chung B, Chang CL, Park SK, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. *J Clin Microbiol* 2000;38:4080-5.
9. Kim SC, Kang SI, Kim DW, Kim SC, Cho SN, Hwang JH, et al. Development and evaluation of an automated stainer for acid-fast bacilli. *Med Eng Phys* 2003;25:341-7.
10. Toman K. How reliable is smear microscopy? In: Frieden TR, ed. *Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring; questions and answers*. 2nd ed. Geneva; World Health Organization, 2004:14-22.
11. Huebner RE, Good RC, Tokars JI. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories. *J Clin Microbiol* 1993;31:771-5.

Evaluation of Automatic Acid-Fast Bacilli Stainer AT-2000F

Shin Young Kim¹, Eun Kyoung Yang¹, Young Jin Kim¹, Sun Min Lee¹, Eun Yup Lee¹, Young Kil Park²,
Gill Han Bai², and Chulhun L. Chang^{1,2}

Department of Laboratory Medicine¹, School of Medicine, Pusan National University, Busan; and Korean Institute of Tuberculosis², Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Background: Sputum smear microscopy is rapid, economic, and useful to detect patients with transmittable tuberculosis, albeit laborious. We aimed to evaluate the usefulness of an automated acid-fast bacilli stainer, which had been developed for lowering the labor and maintaining or increasing the staining quality.

Methods: One hundred sputum samples including some known positive smear specimens which were selected from clinical specimens requested for smear and culture for mycobacteria at Pusan National University Hospital, were used for evaluation. Auramine/rhodamine fluorescent acid-fast stainings were performed manually or by using the automated stainer, AT-2000F (Dagatron, Ilsan, Korea). Ziehl-Neelsen stain was also performed simultaneously.

Results: Concordance rate between automated and manual fluorescent stains was 98.0% and that between automated fluorescent and manual Ziehl-Neelsen stains was 88.0%. In all discordant cases, the automated stains showed one-grade higher results compared to the respective manual fluorescent or Ziehl-Neelsen stains. With the automatic stainer, all staining procedures were processed automatically except for slide loading and unloading. The process time was reduced by a half, and the slide-to-slide or day-to-day variations of staining quality were reduced compared with the manual fluorescent stain.

Conclusion: Acid-fast bacilli stain using automated stainer AF-2000F can reduce the processing time, labor, and variations of staining quality, and enhance or maintain the detection of positive smears.

(Korean J Clin Microbiol 2006;9(2):115-118)

Keywords: Acid-fast bacilli stain, Automatic stainer, Clinical evaluation

Address reprint requests to : Chulhun L. Chang, M.D., Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea.
TEL. +82-51-240-7417 FAX. +82-51-247-6560 E-mail: CCHL@pusan.ac.kr