

Evaluation of Combined Use of BacT/ALERT 3D Liquid Culture System and PCR-RFLP for Detection and Identification of Mycobacteria from Bronchial Specimens

Hae-Sun Chung, Chang-Seok Ki, Jang Ho Lee, Nam Yong Lee

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: We evaluated BacT/ALERT 3D liquid culture system (bioMérieux, USA) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) for recovery and direct identification of mycobacteria, and the results were compared with a conventional culture system using an egg-based solid medium.

Methods: A total of 3,037 bronchial specimens (2,309 bronchial washing fluids and 728 bronchoalveolar lavages) were collected. Decontaminated specimens were inoculated to both BacT/ALERT MP liquid media and Ogawa solid media (3%, Shinyang, Korea). Recovery rate and detection time were compared between the two systems. Liquid media from positive cultures were centrifuged and the pellets were tested for direct identification of mycobacteria by PCR-RFLP using Myco-ID (M&D Inc., Korea).

Results: A total of 518 isolates, including 215 *M. tuberculosis* (MTB) and 303 non-tuberculosis mycobacteria (NTM), were recovered. The liquid media detected 492 isolates (16.2%), including 195 MTB and

297 NTM), whereas the solid media detected 416 isolates (13.7%), including 187 MTB and 229 NTM ($P < 0.001$); 102 isolates (28 MTB and 74 NTM) were recovered only by the liquid media, while 26 (20 MTB and 6 NTM) isolates were recovered only by the solid media. The mean time to detection was 18.1 days by the liquid media and 29.3 days by the solid media ($P < 0.001$). The overall time to species identification from inoculation was 21.8 days. Direct PCR-RFLP from the liquid media identified 39.1% of MTB, 6.3% of *M. avium*, 19.05% of *M. abscessus*, and 12.6% of *M. intracellulare* respectively.

Conclusion: Combined use of a liquid culture system and PCR-RFLP improved the recovery rate and shortened the detection time. However, solid media is still necessary to maximize the diagnostic efficiency. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:37-42)

Key Words: Mycobacteria, Culture, Liquid media, PCR-RFLP, Bronchial specimen

서 론

마이코박테리아에는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 나병균(*M. leprae*)과 이들을 제외한 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM) 등이 포함된다. MTB에 의한 폐결핵과 NTM에 의한 NTM 폐질환은 대표적인 폐 마이코박테리움 감염(Mycobacterial pulmonary infection)으로써, 전 세계적으로 중요한 질환이며 많은 관심의 대상이다[1-3]. 특히 우리나라는 폐결핵의 유병률이 높고, 최근에는 NTM 폐질환의 중요성도 강조되고 있다[4].

Received 5 August, 2008, Revised 12 December, 2008

Accepted 25 February, 2009

Correspondence: Nam Yong Lee, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50 Ilwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea. (Tel) 82-2-3410-2706, (Fax) 82-2-3410-2719, (E-mail) micro.lee@samsung.com

폐 마이코박테리움 감염의 효과적인 관리에 있어서 신속하고 정확한 진단은 필수적이다. 그러나 기존의 전통적인 검사방법인 항산균 염색과 배양 검사는 한계가 있었다. 항산균 염색은 저렴하고 간편하며 검사 결과를 빨리 얻을 수 있는 장점이 있으나, MTB와 NTM을 구별할 수 없고 민감도와 특이도가 낮은 단점이 있다. 배양 검사의 경우, 가장 확실한 방법이며 표준 진단법(gold standard) 방법이지만 오랜 시간이 필요하다는 단점이 있다. 배양 배지는 크게 고체 배지와 액체 배지로 구분되는데, 특히 고체 배지의 경우 검출 시간이 길고 액체 배지에 비해 민감도가 낮다. 그에 비해 액체 배지는 검출 시간이 빠르고 검출률이 높으며, 장비를 이용하여 더 편리하게 우수한 성과를 얻을 수 있다. 그러나 액체 배지는 오염률이 높고, 배양 양성이 MTB와 NTM을 구별할 수 없으며, 비용이 높다는 등의 단점도 있다. 현재 시판되어 이용되고 있는 액체 배지 배양 장비로는 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), VersaTRECK (ESP culture system II; Trek

Diagnostics, Inc., Westlake, OH, USA), BacT/ALERT 3D liquid culture system (bioMérieux, Durham, NC, USA) 등이 있다[5,6]. 마이코박테리아 배양 시 Center for Disease Control (CDC), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), College of American Pathologists (CAP) 등에서는 액체 배지와 고체 배지를 포함하여 두 개 이상의 배지를 사용하도록 권고하고 있다[1,7-9]. 그러나 국내에서는 아직 액체 배지의 사용이 제한되어 있는 실정이다[10].

본 연구에서는 기관지 검체에서 액체 배지 배양 자동화 장비 BacT/ALERT 3D liquid culture system과 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)을 이용하여 마이코박테리아의 검출 및 동정을 시행하고, 기준의 고체 배지 배양과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료

2006년 4월부터 2007년 9월까지 결핵균 도말 및 배양 검사가 의뢰된 총 3,037건의 기관지 검체(기관지 세척액 2,309예, 기관지폐포 세척액 728예)를 대상으로 하였다.

2. 검체 전처리

50 mL의 원추형 시험관에 검체와 동량의 N-acetyl-L-cysteine (NALC)-2% NaOH 용액을 넣고 15분간 실온에 방치 후 멸균 중류수로 50 mL까지 채워 냉장 원심분리기에서 3,000 g에서 15분간 원침하였다. 상청액을 제거하고 남은 침전물로 염색과 배양을 실시하였다.

3. 항산균 염색 및 결과 판독

전처리가 끝난 검체를 유리 슬라이드에 도말한 후 형광 염색법으로 항산균 염색을 실시하였다. 형광 염색 결과 CDC의 기준에 의한 “±” 이상의 슬라이드는 Ziehl-Neelsen 염색법으로 확인하여 CDC 판정법에 따라 보고하였다.

4. 마이코박테리아 배양

전처리된 검체를 고체 배지(3% Ogawa; Shinyang Chemical Co., Seoul, Korea)에 접종하여 37°C에서 배양하였고, 1주에 한 번씩 8주 동안 군집락을 관찰하였다. 또한 동시에 Middlebrook 7H9 broth base가 포함되어 있는 BacT/ALERT MP 액체 배지 (bioMérieux, Durham, NC, USA)에 접종하여 BacT/ALERT 3D liquid culture system에 배양하였다. BacT/ALERT 3D liquid culture system은 매 10분마다 마이코박테리아가 성장하면 생성되는 CO₂를 pH 변화로 감지하여 정해진 알고리즘에 따라 지속적으로 마이코박테리아 성장 유무를 자동으로 검색한다. 장비에서 양성 신호가 발생되면 배양병을 꺼내어 배양액을 원심 분리하여 침사를 얹어 항산균 염색을 실시하고 군 동정을 실시하였다. BacT/ALERT MP 액체 배지에서 양성 신호가 발생되었지만, 이후 배양액 항산균 염색이나 군종 동정에서 음성 결과가 나온 경우는 위양성으로 판단하였다.

5. 마이코박테리아의 군종 동정

배양 양성인 BacT/ALERT MP 액체 배지 병에서 배양액을 취해 100°C 끓는 물에 20분간 담가 놓은 후 원심분리하여 추출된 DNA로 직접 Myco-ID (M&D, Seoul, Korea)를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 마이코박테리아의 군종 수준까지 동정하였다. Myco-ID는 *rpoB* 유전자의 다형성을 이용한 것으로, *rpoB* 유전자의 일정 부위를 다량 증폭한 후 제한효소 처리를 하여 절편의 크기에 따라 키트에 포함된 ‘마이코박테리아 및 노카다이아 동정 알고리즘’표를 기준으로 군을 동정한다.

6. 통계 처리

두 배양 방법 간의 비교는 SPSS 프로그램(Window version 11.5)을 이용하여, 검출률의 차이는 McNemar's test 검정을 하였고, 검출 시간의 차이는 Wilcoxon signed rank test 검정을 시행하였다. 통계적 유의 수준은 *P*값 0.05 이하로 하였다.

Table 1. Isolations of mycobacteria from 3,037 specimens

Egg-based solid media	Result	BacT/ALERT liquid media					
		MTB		NTM		Total	
		+	-	+	-	+	-
	+	167	20	223	6	390	26
	-	28	2,822	74	2,734	102	2,519
	<i>P</i> -value	0.312		<0.001		<0.001	

Abbreviations: MTB, *M. tuberculosis*; NTM, nontuberculosis mycobacteria.

결 과

1. 검출률 비교(Table 1)

총 3,037개의 검체 중 518검체(17.1%)에서 항산균이 배양되었다. 이 중 MTB는 215건(7.1%), NTM은 303건(9.9%)이었다. BacT/ALERT MP 액체 배지에서는 492건(16.2%; 195 MTB, 297 NTM)이 검출되었고, 고체 배지에서는 416건(13.7%; 187 MTB, 229 NTM)이 검출되었다. BacT/ALERT MP 액체 배지와 고체 배지의 검출률 차이가 MTB에서는 유의하지 않았으나 ($P=0.312$), 마이코박테리아 전체와 NTM에서는 유의한 차이가 있었다($P<0.001$).

BacT/ALERT MP 액체 배지에서만 검출된 경우는 102건(3.4%; 28 MTB, 74 NTM)이었고, 고체 배지에서만 검출된 경우는 26건(0.9%; 20 MTB, 6 NTM)이었다.

BacT/ALERT MP 액체 배지에서 위양성인 경우는 총 3,037 개의 검체 중에 66건(2.2%)이었으며, 고체 배지가 오염된 경우는 62건(2.0%)이었다.

2. 검출 시간 비교(Table 2)

마이코박테리아를 검출하는 데 소요된 평균 시간은 BacT/ALERT MP 액체 배지에서는 18.1일, 고체 배지에서는 29.3일로 유의한 차이가 있었다($P<0.001$). 이러한 검출 시간의 차이

Table 2. Time (days) to detect mycobacteria

Method	BacT/ALERT liquid media	Egg-based solid media	P-value
MTB	24.6	30.8	<0.001
NTM	12.8	28.0	<0.001
Total	18.1	29.3	<0.001

Abbreviations: See Table 1.

Table 3. Isolation frequency of mycobacteria from bronchial specimen

	No. of isolates (%)
<i>M. tuberculosis</i>	171 (39.1)
<i>M. avium</i>	115 (26.3)
<i>M. abscessus</i>	83 (19.0)
<i>M. intracellulare</i>	55 (12.6)
<i>M. fortuitum</i>	2 (0.5)
<i>M. kansasi</i>	2 (0.5)
<i>M. szulgai</i>	2 (0.5)
<i>M. cheloneae</i>	1 (0.2)
<i>M. gordonae</i>	6 (1.4)
Total	437

는 MTB, NTM 모두에서 유의하게 나타났다. BacT/ALERT MP 액체 배지에 접종 후 양성 배양병에서 직접 PCR-RFLP를 이용하여 균을 동정하기까지 소요된 총 평균 시간은 21.8일이었다.

3. 마이코박테리아 균종 동정 결과(Table 3)

BacT/ALERT MP 액체 배지 양성 중 총 468개의 배양병에서 추출한 DNA로 직접 PCR-RFLP를 시행하여 총 437건의 마이코박테리아를 동정하였다. 22건(5.0%)은 증폭 산물을 얻는 데 실패하였으며, 9건(2.1%)은 동정 알고리즘에 의해 동정이 되지 않았다. 동정된 마이코박테리아 중 MTB가 가장 흔했고(39.1%), 그 다음으로 *M. avium* (26.3%), *M. abscessus* (19.0%), *M. intracellularare* (12.6%) 순으로 흔하게 동정되었다. 다른 균종은 1% 미만으로 동정되었다. 전체 동정된 마이코박테리아 중 NTM의 비율은 60.9%였다. 2가지 이상의 마이코박테리아가 배양된 경우는 1건이었다.

고 찰

본 연구 결과, BacT/ALERT MP 액체 배지에서는 양성 검체의 95.0%가 검출되었고, 고체 배지에서는 양성 검체의 84.6%만 검출되어, BacT/ALERT MP 액체 배지의 마이코박테리아 검출률이 고체 배지보다 우수하였다. 그 차이는 MTB (90.1 vs. 87.0%)에서는 유의하지 않았으나($P=0.312$), 마이코박테리아 전체(95.0 vs. 84.6%)와 NTM (98.0 vs. 75.6%)에서는 유의하게 BacT/ALERT MP 액체 배지가 고체 배지보다 검출률이 높았다($P<0.001$). Gil-Setas 등의 연구[11]에서는 MB/BacT 배지(Organon Teknika, Turnhout, Belgium)에서는 90.1%, Lowenstein-Jensen (L-J) 배지(Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)에서는 77.5%가 검출되었다고 하였고, Mirovic과 Lepsanovic[12]은 MB/BacT 배지(Organon Teknika, Durham, NC, USA)에서는 93.2%, L-J 배지에서는 67.3%로 보고한 바 있다. 또한, Ogawa 배지와 액체 배지를 비교한 Abe 등의 연구[13]에서 3% Ogawa 배지에서의 검출률은 75.6%로 액체 배지 배양 장비인 BACTEC에서의 93.0%보다 유의하게 낮았다. 이상의 연구들에서 액체 배지가 계란기초의 고체 배지인 L-J 배지와 Ogawa 배지보다 우수한 검출률을 보이는 것을 확인할 수 있고, 그 외에도 여러 논문들에서 일관되게 액체 배지가 고체 배지에 비해서 마이코박테리아의 검출에 유리하다고 보고되고 있다[14-17]. 하지만 액체 배지와 고체 배지를 병용 시 검출률이 높아진다는 점이 보고된 바 있으며[11,14,17,18], 본 연구에서도 고체 배지에서만 검출된 경우가 총 양성 검체 중 5.0%, 특히 MTB 양성 검체 중 9.3% 있어, 고체 배지 배양도 배양의 민감도를 높이기 위해 필요할 것으로 판단된다. 이는 CDC, CLSI, CAP 등에서 권고하는 바와도 일치한다[1,7-9].

BacT/ALERT MP 액체 배지에서의 위양성은 다른 세균의 성장 등으로 인한 pH의 변화에 의한 것으로, 본 연구에서는 2.2%의 위양성률을 보였다. 위양성인 경우, 마이코박테리아에 대한 검사 이외의 세균에 대한 검사를 시행하지 않아, 위양성 중 오염에 의한 것을 정확히 구분할 수는 없었지만, 상당 부분이 오염에 의한 위양성일 것으로 생각된다. 기존의 액체 배지에 대한 연구에서 오염률이 1.6~9%로 다양하게 보고되고 있는데, 일반적으로 고체 배지보다 높은 것으로 알려져 있다[11-16]. 한편, 일부 연구에서 오염률과 구별하여 위양성률을 0~0.95%로 보고하였다[11,14,16]. 본 연구에서 오염률을 포함한 전체 위양성률은 기존에 알려진 것보다 낮은 수준이며, 고체 배지의 오염률과 크게 차이가 없는 것으로 나타났다.

마이코박테리아가 검출된 시간에 있어서 BacT/ALERT MP 액체 배지가 고체 배지보다 유의하게 빨라(18.1 vs. 29.3일) 결과 보고를 10일 이상 단축할 수 있었다. 이 차이는 MTB (24.6 vs. 30.8일)와 NTM (12.8 vs. 28.0일) 모두에서 유의하였으며 ($P<0.001$), 특히 NTM에서 매우 단축되었다. BacT/ALERT 3D system의 경우 기기에 의한 양성 신호 검출의 예민도가 높고, 매 10분마다 지속적으로 균의 성장을 감시 및 보고하는 방법으로 운용되기 때문에 1주일에 한 번 빈도로 균 집락 유무를 육안으로 확인하는 고체 배지에 비해 균의 성장을 검출하는 데 소요되는 시간이 단축될 수 있었다. 기존의 액체 배지와 고체 배지 비교 연구들에서도 액체 배지 사용 시 검출 시간이 단축됨이 보고되었다[11-16]. 하지만 본 연구에서 균을 동정하기까지 소요된 총 평균 시간은 21.8일로, CDC에서 권고하는 동정 소요 기간인 14일에는 미치지 못하였다. 이는 대상 검체가 기관지 검체 중 기관지 세척액과 기관지폐포 세척액이어서 균이 희석되었을 가능성에 의한 것일 수 있다. 또한 낮은 오염률이 검출 시간의 연장과 관계가 있다는 보고가 있어[16], 본 연구의 결과를 뒷받침한다.

마이코박테리아 균종 동정 결과 MTB가 단일 균종으로는 가장 흔하게 분리되었으며(39.1%), 그 외 흔하게 분리된 NTM은 *M. avium* (26.3%), *M. abscessus* (19.0%), *M. intracellulare* (12.6%)이었다. NTM의 균종 비율은 지역적인 차이가 있는 것으로 알려져 있으며[19], 본 연구에서 발견된 흔한 NTM 균종은 다른 국내 연구와 비슷한 결과였다[19-24]. 한편, 전체 NTM의 비율은 60.9%로 다소 높은 비율이었는데, 그 요인으로 대상 검체가 기관지경을 시행하여 채취한 기관지 검체라는 점, 본원에 내원한 NTM 폐질환 환자의 비율이 타 병의원에 비해 높다는 점 등을 생각해 볼 수 있다.

본 연구 결과에서 확인하였듯이, 액체 배지가 검출률이 높고 검출 시간이 빠르다는 장점이 있으나, 반면 몇 가지 단점도 지적되고 있다. 그 중 액체 배지에서 양성 시, 육안으로 균종이 구별되는 고체 배지에서와는 달리, MTB와 NTM의 감별이 안 된다는 점이 있다. 하지만 이러한 단점은 본 연구에서 시행한

PCR-RFLP나 다른 MTB를 검출할 수 있는 문자유전학적 방법을 동원하면 극복할 수 있을 것이다. 또 액체 배지 사용의 중요한 단점이 비용 측면에서 불리하다는 점이며, 이 점 때문에 국내에서의 액체 배지 사용이 제한되어 있는 실정이다.

국내에서는 마이코박테리아의 액체 배지 배양에 대한 연구로는 BACTEC MGIT 960 system에 대한 평가가 주로 이루어져 있고[25-28], BacT/ALERT MP 액체 배지에 대한 평가는 부족한 설정이다[29]. 한편, 마이코박테리아 균 동정을 위한 PCR-RFLP 방법에 대한 연구는 보고된 바 있으나[30], 양성 액체 배지를 검체로 한 연구도 부족하다. 따라서, 본 연구가 국내에서 BacT/ALERT 3D liquid culture system과 PCR-RFLP의 병용에 대해 평가한 첫 번째 연구이며, 유용한 정보를 제공할 것으로 생각된다.

그러나 이 연구에서는 몇 가지 제한점이 있었는데, 그 중 임상적 의의에 대한 고려가 배제된 점을 들 수 있다. 특히, NTM의 경우 NTM 폐질환의 유무는 임상 양상, 영상 소견 등 다양한 임상 소견을 바탕으로 판단되며, 검사실에서의 NTM의 동정이 중요한 의미를 가지지만, 절대적인 지표는 아니다[31]. 따라서, 앞으로 분리된 NTM의 임상적 의의에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한, 본 연구에서 시행한 방법을 실제 검사실에 모두 적용할 수 있을지에 대해서 인력이나 재정적인 문제에 대한 고려가 필요할 것이다.

결론적으로, 마이코박테리아 배양 시 BacT/ALERT 3D system 액체 배지를 사용함으로써 검출률을 높일 수 있었으나, 검출률을 최대화하기 위해서는 고체 배지와의 병용이 권고된다. 또한, 액체 배지 배양과 PCR-RFLP의 병용은 검출률을 높일 뿐 아니라, 마이코박테리아 검출 시간과 균종 동정까지의 시간을 단축할 수 있어, 폐결핵 및 NTM 폐질환 환자의 조기 진단 및 치료에 많은 도움이 될 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Shinnick TM, Iademarco MF, Ridderhof JC. National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systems approach. Recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force on Tuberculosis Laboratory Services. MMWR Recomm Rep 2005;54:1-12.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:367-416.
- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization, (WHO/HTM/TB/2007.376).
- Hwang EJ. Evaluation of a tuberculosis control program at community health centers. J Korean Acad Public Health Nurs 2007;21:241-51.
- Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: Isengerg HD, ed. Clinical Microbiology Proce-

- dures Handbook. 2nd ed, Washington, D.C.; ASM Press, 2004: 71-8.
6. Pfyffer GE. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, Washington, D.C.; ASM Press, 2007: 543-72.
 7. WHO. New WHO Policies: Liquid culture background document. <http://www.who.int/tb/dots/laboratory/policy/en/index.html> [Online] (last visited on 15 July 2008).
 8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory detection and identification of mycobacteria; proposed guideline. CLSI document M48-P. Wayne, PA; CLSI, 2007.
 9. College of American Pathologists. CAP Microbiology Checklists. <http://www.cap.org> [Online] (last visited on 15 July 2008).
 10. Chang CL, Park TS, Kim MN, Lee NY, Lee HJ, Suh JT. Survey on changes in mycobacterial testing practices in Korean laboratories. *Korean J Clin Microbiol* 2001;4:108-14.
 11. Gil-Setas A, Torroba L, Fernandez JL, Martinez-Artola V, Olite J. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:224-8.
 12. Mirovic V and Lepsanovic Z. Evaluation of the MB/BacT system for recovery of mycobacteria from clinical specimens in comparison to Lowenstein-Jensen medium. *Clin Microbiol Infect* 2002;8: 709-14.
 13. Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, Kazumi Y, Takahashi M, Hirano K, et al. Comparison of MB-Check, BACTEC, and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992;30: 878-81.
 14. Alcaide F, Benitez MA, Escribà JM, Martin R. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* 2000;38:398-401.
 15. Harris G, Rayner A, Blair J, Watt B. Comparison of three isolation systems for the culture of mycobacteria from respiratory and non-respiratory samples. *J Clin Pathol* 2000;53:615-8.
 16. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, et al. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2001;39:651-7.
 17. Adler H, Straub C, Frei R. Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:499-500.
 18. Crump JA, Tanner DC, Mirrett S, McKnight CM, Reller LB. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* 2003;41:1987-90.
 19. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. *Chest* 2006;129:341-8.
 20. Lee JY, Choi HJ, Lee H, Joung EY, Huh JW, Oh YM, et al. Recovery rate and characteristics of nontuberculous mycobacterial isolates in a university hospital in Korea. *Tuberc Respir Dis* 2005;58:385-91.
 21. Koh WJ, Kwon OJ, Ham HS, Suh GY, Chung MP, Kim HJ, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens. *Korean J Med* 2003;65:10-21.
 22. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci* 2005;20:913-25.
 23. Lew WJ, Ahn DI, Yoon YJ, Cho JS, Kwon DW, Kim SJ, et al. Clinical experience on mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 1992;39:425-32.
 24. Bai GH, Park KS, Kim SJ. Clinically isolated mycobacteria other than mycobacterium tuberculosis from 1980 to 1990 in Korea. *J Korean Soc Microbiol* 1993;28:1-5.
 25. Kim YS, Jo YH, Lee HJ, Suh JT, Lee YJ. Comparison of MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) with Ogawa media for recovery of mycobacteria. *Korean J Clin Microbiol* 2001;4:58-61.
 26. Choi YM. Evaluation of MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from body fluids. *Korean J Clin Microbiol* 2003; 6:69-73.
 27. Choi YM and Lee MH. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:56-61.
 28. Lee JY, Kim JP, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* using BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 system-Comparision with BACTEC 460 TB system and Ogawa media. *Korean J Lab Med* 2000;20: 384-91.
 29. Lee KE, Park DS, Lee YJ, Cho JH. Effects on detection rate and turnaround time by changes in the mycobacterial culture and identification methos. *Korean J Lab Med* 2005;25:46-52.
 30. Park CM, Heo SR, Park KU, Song J, Lee JH, Lee CT, et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Korean J Lab Med* 2006;26:161-7.
 31. Yang HY, Lee HJ, Park SY, Lee KK, Suh JT. Comparison of in-house polymerase chain reaction assay with conventional techniques for the detection of mycobacterium tuberculosis. *Korean J Lab Med* 2006;26:174-8.

=국문초록=

기관지 검체에서의 마이코박테리아 검출 및 동정을 위한 BacT/ALERT 3D System과 PCR-RFLP 병용

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과

정혜선, 기창석, 이장호, 이남용

배경: 본 연구에서는 기관지 검체에서 액체 배지 배양 자동화 장비 BacT/ALERT 3D liquid culture system (bioMérieux, USA)과 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)을 이용하여 마이코박테리아의 겹출 및 동정을 시행하고, 기존의 고체 배지 배양과 비교하였다.

방법: 2006년 4월부터 2007년 9월까지, 총 3,037건의 기관지 검체(기관지 세척액 2,309예, 기관지폐포 세척액 728예)를 대상으로, BacT/ALERT MP 액체 배지(bioMérieux, USA)와 고체 배지(3% Ogawa; Shinyang, Korea)에 동시에 접종하여, 두 방법 간의 검출률과 검출 시간의 차이를 비교하였다. BacT/ALERT MP 액체 배지에서 양성이면, Myco-ID (M&D Inc., Korea)를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 균종을 동정하였다.

결과: 총 3,037개의 검체 중 518검체(17.1%)에서 항산균이 배양되었으며, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 215건, non-tuberculous mycobacteria (NTM) 303건이었다. 액체 배지에서는 492건(16.2%; 195 MTB, 297 NTM), 고체 배지에서는 416건(13.7%; 187 MTB, 229 NTM)이 검출되었다($P<0.001$). 액체 배지에서만 검출된 경우는 102건(28 MTB, 74 NTM)이었고, 고체 배지에서만 검출된 경우는 26건(20 MTB, 6 NTM)이었다. 마이코박테리아를 검출하는 데 소요된 평균 시간은 액체 배지가 고체 배지보다 빨랐다(18.1 vs 29.3일; $P<0.001$). 액체 배지에 접종 후 균을 동정하기까지 소요된 총 평균 시간은 21.8일이었다. 양성 액체 배지로 직접 PCR-RFLP를 시행한 결과, MTB (39.1%), *M. avium* (26.3%), *M. abscessus* (19.0%), *M. intracellulare* (12.6%) 등이 동정되었다.

결론: 액체배지 배양과 PCR-RFLP의 병용은 검출률을 높이고 검출 시간을 단축시킬 수 있었으며, 검출률을 최대화하기 위해 고체 배지와의 병용이 권고된다. [대한임상미생물학회지 2009;12:37-42]

교신처자 : 이남용, 135-710, 서울시 강남구 일원동 50번지
삼성서울병원 진단검사의학과
Tel: 02-3410-2706, Fax: 02-3410-2719
E-mail: micro.lee@samsung.com