



결핵검사지침

Manual of Laboratory Tests for Tuberculosis



질병관리본부



국립보건연구원
Korea National Institute of Health



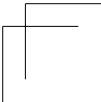
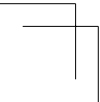
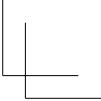
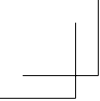
대한임상미생물학회
The Korean Society of Clinical Microbiology

결핵검사지침

결핵검사지침

2013.

질병관리본부 국립보건연구원
대한임상미생물학회



인사말

결핵은 후진국형 질병이지만, 우리나라는 경제력에 부합되지 않게 결핵 발생률이 OECD 국가 중 1위로 우리나라 감염병 중 환자 및 사망자가 가장 많고 높은 질병부담을 초래하고 있습니다. 중·고등학교를 중심으로 한 소집단 결핵의 발생 증가, 치료가 어려운 다제내성 및 광범위내성 환자의 출현 등 국민 보건의 안전을 위협하고 있고, 이에 국가와 민간은 역량을 집중 투입하여 결핵퇴치를 실현하고자 노력하고 있습니다.

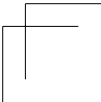
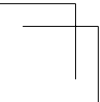
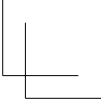
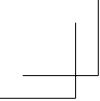
결핵 조기 퇴치를 위해서는 무엇보다 먼저 결핵을 신속하고 정확하게 진단하여 환자를 적절히 치료함으로써 전파를 방지하여야 합니다. 이에 기본이 되는 것이 표준화되고 신뢰성 있는 결핵 검사 방법의 적용일 것입니다. 이 지침은 가장 흔히 이용되는 결핵 검사법인 객담도말검정부터 항산균 배양과 동정, 항결핵제 감수성 검사, 그리고 이에 수반되는 생물안전에 대하여 작성되었습니다. 국내 검사실들에서 실제 수행되고 있는 결핵 검사 방법은 검사실 간의 차이가 있고 또 사용하는 기준도 다르다는 어려움이 있습니다. 이 지침은 이를 보완하고 국내 현실에 맞추기 위하여 관련 학계 및 현장 전문가의 의견 조율과 검토를 거쳐 만들어졌습니다.

이 지침이 일선 보건 검사 기관에서 결핵을 진단하는 데 유익하게 활용됨은 물론이고 이 분야를 연구하는 학계에도 널리 이용될 것을 믿어 의심치 않습니다. 또한 국내 결핵 검사실의 질을 높이고, 동시에 검사실 간의 결핵검사의 차이를 해소하여 추후 국내 결핵 검사의 표준화에 도움이 되리라 기대합니다.

끝으로 이 지침 발간을 위해 노력해 주신 결핵검사이침 집필위원과 관련 학회 및 기관 등 도움 주신 모든 분께 깊은 감사드립니다.

2013년 6월

국립보건연구원장
조 명 찬



차례

머리말	1
결핵검사지침 집필위원 명단	4
결핵검사지침 요약	5
I. 결핵검사실의 생물안전	7
1. 가이드라인	9
2. 세부 절차	12
2.1. 시설, 장비, 개인보호장비 및 소독제	12
2.2. 검사 과정	14
2.3. 검사자의 건강 검진	17
2.4. 참고문헌	17
II. 검체 전처리	23
1. 가이드라인	25
1.1. 검체 채취 및 보관	25
1.2. 검체 전처리의 원리	27
1.3. 정도관리	29
2. 검사절차	30
2.1. 검체 전처리 전 단계	30
2.2. 검체 채취, 운반 및 보관	30
2.3. 장비 및 기구	30
2.4. 재료 및 시약	30

2.5. 정도관리	34
3. 검체 전처리법	35
3.1. NALC-NaOH법	35
3.2. NaOH법	35
3.3. Z-TSP법	36
3.4. Oxalic acid법	37
3.5. CPC-NaCl법	37

III. 항산균 도말검사 39

1. 가이드라인	41
1.1. 검사원리	41
1.2. 항산균 도말검사의 정도관리	42
1.3. 결과 및 해석	43
1.4. 항산균 도말검사의 결과보고	44
1.5. 항산균 도말검사의 한계	44
1.6. 참고문헌	44
2. 검사절차	45
2.1. 검체 채취, 운반 및 보관	45
2.2. 장비, 기구 및 재료	45
2.3. 정도관리	47
2.4. 검사절차	47
2.5. 검사결과	49
2.6. 항산균의 형태	49
2.7. 결과	49
2.8. 검사결과 보고	50
2.9. 검사의 제한점	50
2.10. 참고문헌	50

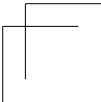
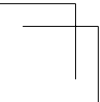
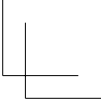
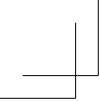
IV. 항산균 배양검사	53
1. 가이드라인	55
1.1. 배양용 검체의 전처리	55
1.2. 배지의 종류와 선택	55
1.3. 배양과정	57
1.4. 결과보고	59
1.5. 항산균 배양검사의 정도관리	60
2. 검사절차	62
2.1. 검사 원리	62
2.2. 장비, 기구 및 재료	62
2.3. 고체배지 배양검사	63
2.4. 액체배지 배양검사	65
2.5. 검사 시 유의할 점	68
2.6. 참고문헌	68
V. 결핵균 동정 검사	73
1. 가이드라인	75
1.1. 표현형적 방법	75
1.2. 유전형적 방법	78
1.3. <i>M. tuberculosis</i> complex 세부균종 동정	80
2. 검사절차	81
2.1. 전통적 생화학 검사	81
2.2. Arylsulfatase 검사	81
2.3. Catalase 검사	83
2.4. 성장 속도와 색소 생성	85
2.5. Crystal violet을 뺀 MacConkey 한천배지에서의 성장 여부	87
2.6. 철 섭취	88
2.7. 5% 염화나트륨 내성	89
2.8. 니아신 축적	90

2.9. 질산염 환원	91
2.10. Pyrazinamidase	93
2.11. Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 억제	94
2.12. Tellurite 환원	96
2.13. Tween 80 가수분해	97
2.14. Urease (Wayne 법)	98
2.15. Gen-Probe AccuProbe를 이용한 동정 검사	99
2.16. 기타 검사법	102
2.17. 참고문헌	103

VI. 항결핵제 감수성검사(Antituberculosis Drug Susceptibility Testing) 107

1. 가이드라인	109
1.1. 항결핵제 내성	109
1.2. 항결핵제 감수성 검사의 원리	109
1.3. Pyrazinamide (PZA) 약제 감수성 검사	112
1.4. 국내 항결핵제 감수성 시험 현황	112
1.5. 검체	113
1.6. 정도관리	113
1.7. 결과 및 해석	114
1.8. 결과보고 및 검사의 한계와 주의점	115
1.9. 참고문헌	116
2. 검사절차	117
2.1. LJ배지 절대농도법(결핵연구원 M-kit)	117
2.2. LJ배지 내성비율법	120
2.3. 한천배지 내성비율법	122
2.4. 판정 및 보고	125
2.5. MGIT 960 감수성 시험	126
2.6. Pyrazinamidase 검사(PZase test, Wayne test)	130

부록	137
1. McFarland 탁도표준(McFarland turbidity standard) 제조	139
1.1. 원리	139
1.2. 시약과 재료	139
1.3. 제조방법	140
1.4. 사용방법	140
1.5. 주의 사항	141
1.6. 정도관리	142



머리말

결핵은 호흡기로 전파되는 전염병으로 우리나라뿐만 아니라 전세계적으로 인류건강을 위협하는 중요한 질병이다. 우리나라는 지난 50년간의 경제발전과 결핵관리사업으로 꾸준히 환자발생이 감소하여 결핵 부담이 중간급인 나라로 분류되고 있다. 결핵의 발생빈도는 2004년엔 인구 10만 명당 65.4명, 2009년에는 97.0명으로 보고되어 결핵은 여전히 중요한 국가적 문제가 되고 있다. OECD 국가 중 결핵빈도가 가장 낮은 아이슬랜드와 비교할 때 우리나라의 결핵발생빈도는 29배, 사망률은 33배나 더 높은 실정이다. 뿐만 아니라 최근에는 치료가 어려운 다제내성 혹은 광역내성 등의 약제내성 결핵균주가 출현하여 공공의 건강을 위협하는 심각한 문제가 되고 있다. 따라서 결핵을 조기에 진단하여 적절히 치료하고 전파를 방지하기 위해서는 신속하고 신뢰성있는 검사가 필수적이다.

결핵검사는 결핵의 진단, 치료반응 평가, 항결핵제 내성 확인 및 잠복결핵의 진단 등에 이용되고 있다. 현재 검사실에서 시행되고 있는 주요 결핵검사로는 오랫동안 사용되어 온 항산균 도말검사, 배양검사 및 통상적 약제 감수성 검사 이외에도 비교적 최근에 소개된 결핵균 핵산증폭 검사, 신속내성검사 및 인터페론감마 분비 검사 등이 있다. 결핵 환자의 진단과 치료를 위해서는 한 가지 검사보다는 다수의 검사 결과를 조합하여 판정하는 것이 중요한데, 이를 위해서는 개개의 검사가 적절한 검사지침에 의해 시행되어 정확하고 신속한 결과를 제공하는 것이 필요하다.

현재 국내 검사실에서 실제 수행되는 결핵검사 방법은 검사실 간의 차이가 크고 또 사용하는 기준도 다른 것이 사실이다. 주로는 미국 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 지침서를 참고하고 있으나 미국과 우리나라는 결핵 유병률이 크게 다르고 검사실 여건도 다르기 때문에 적용하기 힘든 경우가 있다. 반면 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 지침서는 결핵 고부담 자원부족국가를 주로 대상으로 하기 때문에 도말검사 등의 통상검사를 이용하는 데 치중하고 있어 국내 검사실에서는 거의 적용되고 있지 않다.

결핵 검사실에서 환자의 검체를 대상으로 결핵검사를 적절히 수행하기 위해서는 검사 분석 전, 분석 중, 그리고 분석 후의 각 과정에서 검사의 표준화가 요구된다. 또한 결핵검사를 수행하는 동안 검사실내 직원의 감염을 방지하기 위한 생물학적 안전성 지침과 기구 및 시설을 설치하는 것이 필요하다. 본 지침은 국내의 결핵검사실에서 이용되고 있는 각종 결핵 검사지침과 최근의 연구결과를 토대로 우리나라 검사실에서 결핵진단을 위하여 시행하기에 가장 적합한 결핵 검사 지침을 제공하고자 하였다. 본 결핵 검사지침서는 국내 검사실의 결핵검사 질을 높이고, 동시에 검사실 간의 결핵검사의 차이를 해소하고 추후 국내 결핵

검사의 표준화에 도움이 될 것으로 기대된다.

1. 결핵 검사지침서의 범위

본 지침의 범위는 국내 결핵균 검사실에서 결핵 진단을 위해 가장 흔히 이용되는 항산균 도말검사, 항산균 배양과 결핵균의 동정, 그리고 통상적 항결핵제 감수성 검사에 관한 것으로 가장 적절한 검사 방법을 제시함과 동시에 각 검사법의 정도관리 및 검사수행상의 생물학적 안전기준 등을 제시하였다.

2. 결핵 검사지침 개발 방법

대한임상미생물학회를 통해 집필진을 구성하고 질병관리본부와 대한진단검사의학회의 평가와 점검을 통해 공동 감수를 진행하였다. 결핵검사를 위한 아래의 기존 국내외 지침들을 검토하여 국내 검사실 수준에 맞는 지침을 개발하고자 하였다.

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory detection and identification of Mycobacteria; approved guideline M48-A. Wayne, PA: CLSI, 2008.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard-second edition M24-A2. Wayne, PA: CLSI. 2011.
3. Della-Latta P. Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. In: Garcia LS, and Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed, Washington DC.: ASM press, 2010:7.0.1-7.8.8.3.
4. Versalovic J, ed. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed, Washington DC.: ASM press, 2011.
5. 결핵 진료지침 개발위원회. 결핵진료지침. 질병관리본부, 2011.
6. 질병관리본부 국립보건연구원. 실험실생물안전지침(National Guideline for Laboratory Biosafety Manual), 2006.

결핵검사실의 생물학적 안전, 검체의 채취, 수송 및 전처리, 항산균 도말검사, 항산균 배양 및 동정, 항결핵제 감수성 검사 등의 다섯 개의 주요 주제에 대한 지침을 만들고자 하였다. 각 주제별로 임상미생물학적 지식과 결핵균검사에 경험이 많은 진단검사의학 전문의로 집필위원회를 구성하고 각 주제별로 해당 검사에 관한 근거와 주요 사항을 보여주는 가이드라인 부분(각 검사의 정도관리 포함)과 상세한 검사과정을 부록형태로 만든 검사절차 부분(시약, 배지 제조법 포함)으로 나누어 집필하고 상호 점검하도록 하였다. 주기적인 집필진 회의를 통하여 각 검사별로 의견 통일이 되지 않거나 논란의 여지가 있는 주제와 사안을 선

정하여 토론하고 이에 대한 문헌자료를 검토하고 의견을 조율하였다.

3. 전문가 검토, 공청회 개최 및 출간

지침 집필 매뉴얼에 따라 초안을 집필하고 초안에 대해서는 집필진 내부에서 상호검토를 시행하였다. 그리고 2011년 7월 대한임상미생물학회 학술대회에서 국내 주요병원 검사실 전문의와 임상병리사를 대상으로 각 검사별로 의견 통일이 되지 않거나 논란의 여지가 있는 사안을 발표하고 토론하였다. 그 후 지침 집필에 참여하지 않은 전문가들을 외부 검토위원으로 위촉하고 지침의 수정안에 대해 검토를 의뢰하였다. 2011년 10월 대한진단검사의학회 추계학술대회에서 유관 단체 및 기관들을 초청하여 공청회를 통해서 의견을 수렴하였다. 이어 12월 최종공청회에서 외부전문가 검토위원들의 의견과 공청회에서 지적된 사항들에 대해 의견수렴과 보완을 거쳐 최종 결핵검사지침을 완성하였다.

4. 결핵 검사지침 개발의 연차 계획

본 지침(2011년)에는 국내 검사실에서 결핵 진단을 위해 가장 흔히 이용되는 검사실 진단법인 도말검사, 항산균 배양과 결핵균의 동정, 통상적인 항결핵제 감수성 검사, 그리고 이에 수반되는 검사실 안전 등을 다루었다.

2차년(2012년)에는 비교적 최근에 도입되기 시작한 분자생물학적 및 면역학적 방법을 이용한 결핵검사에 대해서 집필을 할 예정이다. 즉, 결핵 진단을 위해 임상 검체에서 직접 시행하는 핵산증폭검사, 분자생물학적 방법을 이용한 신속 내성검사 및 비결핵항산균의 동정 검사를 비롯하여 투베르쿨린 검사, 인테페론감마 분비검사 등의 면역학적 검사법을 다룰 예정이다.

5. 지원

본 결핵검사지침은 2011년 질병관리본부 학술연구용역사업의 지원으로 이루어졌다. 지침개발에 참여한 모든 집필 위원들은 기업이나 다른 이익단체와는 무관함을 밝히는 바이다.

결핵검사지침 집필위원 명단

집필 총괄

신중희 (전남의대)

결핵검사실의 생물안전

가이드라인

김수현 (전남의대)

세부절차

김한성 (한림의대)

검체 전처리 및 항산균 도말검사

가이드라인

박경운 (서울의대)

검사절차

신희봉 (순천향의대)

결핵균(항산균) 배양

가이드라인

박연준 (가톨릭의대)

검사절차

노경호 (고려의대)

결핵균(항산균)의 동정 검사

가이드라인

이종윤 (부산의대)

검사절차

항결핵제 감수성 검사

가이드라인

배혜경 (녹십자의료재단)

검사절차

김창기 (결핵연구원)

외부 전문가위원

장철훈 (부산의대)

김미나 (울산의대)

이혁민 (관동의대)

간사

신희봉 (순천향의대)

결핵검사지침 요약

1. 결핵검사실 안전(또는 생물학적 안전성)

- 결핵검사를 시행하기 위해서는 검사실의 위험도를 평가하고 그 내용에 따라 검사인력, 기구, 과정 등 검사 전반에 걸쳐 생물안전에 대한 문제를 점검해야 한다.
- 객담 전처리 과정과 모든 검체의 배양과정은 성능이 검증된 생물안전작업대(Biological safety cabinet, BSC)에서 시행되어야 한다.
- 전처리과정에서 사용하는 원심분리기는 에어로졸 발생을 방지하기 위해 회전자(rotor) 전체를 덮는 내부 뚜껑과 시험관을 담은 회전용기(bucket)에 개별 뚜껑이 있는 이중차폐장치가 필수적이다.

2. 검체 채취, 수송 및 전처리

- 폐결핵이 의심되는 경우 객담은 2-3회 채취함을 원칙으로 하며 항산균 도말과 배양검사를 동시에 의뢰한다.
- 결핵검사를 위한 모든 검체는 24시간 이내에 검사실로 수송되어야 하며 1시간 이상 지체될 경우 4°C에 보관한다.
- 결핵검사 검체로서 부적절한 경우는 불충분한 양, 여러 번 채취하여 모은 검체, 파손된 검체용기, 검체 채취와 전처리과정간의 적정시간의 경과(7일 이상), 객담이 아닌 타액의 채취, 면봉 검체 등이다.
- 오염제거(decontamination) 과정은 정상상재균에 의한 오염의 가능성이 있는 모든 검체(호흡기 검체, 피부, 위세척액, 소변 등)에서 시행한다.
- 검체 전처리를 위해 가장 흔히 사용되는 방법은 N-acetyl-L-cysteine (NALC)-2% NaOH법이다. 상품화된 자동화 액체에 배양 시스템을 이용할 경우 NALC-2% NaOH법이 권장되나 오염률을 낮추기 위해서 NaOH 농도를 조절할 수 있다.
- 수돗물과 주위 환경에 존재하는 비결핵항산균에 의해 검체가 오염될 경우 도말이나 배양검사에 혼돈을 줄 수 있어 주의해야 한다.

3. 항산균 도말검사

- 항산균 도말검사는 신속하게 처리하는 것이 원칙이며 양성결과는 24시간 이내에 보고해야 한다.
- 객담 검체를 집균하면 항산균 도말검사의 민감도가 33%까지 증가되므로 현재 전세계적으로 권장되고 있는 추세이다.
- 집균 시 원심분리기의 원심력이 항산균 도말검사의 양성률에 직접적인 영향을 주기 때문에 상대원심력



(relative centrifugal force, RCF)이 $3,000 \times g$ 이상인 원심분리기를 이용해야 한다. 결핵균의 생존능을 보존하기 위해 반드시 냉장기능이 있는 원심분리기를 사용해야 한다.

- 형광염색법은 carbol fuchsin법보다 검출률이 더 높고 다량의 검체를 처리할 수 있는 장점이 있어 좋다.
- 항산균 도말검사의 전체 양성률, 도말 양성인면서 배양 양성인 검체 비율, 도말 음성이면서 배양 양성인 검체 비율을 정기적으로 산정하여 비교한다.

4. 항산균 배양검사

- 액체배지를 사용할 경우 검출시간이 크게 단축되며 양성률이 향상되고 고체배지는 오염이 적은 장점이 있어 두 배지를 모두 사용해야 한다.
- 배양검사서 항산균의 증식이 확인되면 신속하게 결핵균과 비결핵항산균을 감별하여 보고한다.
- 항산균 동정을 위해서 균 집락 성상이나 생화학검사보다는 분자생물학적 동정 검사법이나 항원검출법 등이 권장된다.
- 배양된 균주는 약제 감수성 시험 등의 추가 검사를 위해 6개월간 보관한다.
- 배양 양성률과 오염률을 정기적으로 점검하는 것이 중요하다. 고체배지를 이용할 경우 오염률은 2-5%로 유지하며 액체배지를 사용할 경우 그 보다는 약간 더 높게(10% 이하) 유지하는 것이 필요하다. 배양 양성률은 주기적으로 점검하며 양성률이 유의하게 높아지는 경우 검사실내 오염을 고려한다.

5. 항결핵제 감수성 검사

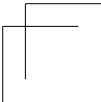
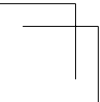
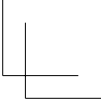
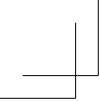
- 항결핵제 감수성 검사는 모든 결핵 환자의 첫 배양 분리주에 대해 실시하며 3개월 이상 치료에도 배양 양성이거나 임상적으로 치료실패가 의심되는 경우에도 실시한다.
- 내성비율법은 전세계적으로 표준검사법으로 사용되고 있으며 내성균의 비율이 1%를 넘을 경우 내성으로 판정한다.
- 국내에서 가장 흔히 사용되는 항결핵제 감수성 검사의 방법은 절대농도법이며 여러 약제의 내성을 쉽고 간편하게 검출할 수 있다.
- 비결핵항산균에 대한 감수성 검사법은 항결핵제 감수성 검사와 다르며 비결핵항산균은 보통 항결핵제에 내성이므로 다제내성결핵 혹은 광역내성결핵으로 오인될 가능성이 있다. 따라서 감수성 검사에서 결핵균이 아닌 비결핵항산균이 증식하면 판정불가로 보고한다.
- BACTEC MGIT 960 (BD, USA) 시스템은 상품화된 자동 액체배양 결핵 검출기로서 1차 약제(isoniazid, rifampin, ethambutol, streptomycin 및 pyrazinamide)에 대한 감수성 검사를 시행할 수 있다.
- Rifampicin과 isoniazid에 대한 신속내성 검사는 빠른 결과를 얻을 수 있어 유용하다.

I. 결핵검사실의 생물안전

결핵검사이침

1. 가이드라인	9
2. 세부 절차	12
2.1. 시설, 장비, 개인보호장비 및 소독제	12
2.2. 검사 과정	14
2.3. 검사자의 건강 검진	17
2.4. 참고문헌	17





I. 결핵검사실의 생물안전

1. 가이드라인

질병관리본부 생물안전지침에 따르면 미생물은 사람에 대한 위해도에 따라 네 가지 위험군으로 분류되는데 결핵균은 제 3 위험군에 속한다(표 1). 즉 사람에게 발병하였을 경우 증세가 심각할 수 있으나 치료가 가능한 병원체를 의미한다. 국내 대부분의 결핵검사실에서 결핵균 양성율이 높고, 결핵균은 10마리 미만의 적은 수로도 감염을 일으킬 수 있으므로 결핵검사실에 의뢰된 모든 검체는 감염원으로 간주하고 검사실의 생물안전지침에 따라 검사를 수행해야 한다.

표 1. 미생물의 위험군 구분(실험실생물안전지침 2006)

구분	정의	해당 미생물
제 1 위험군	건강한 성인에게는 질병을 일으키지 않는 것으로 알려진 생물체	<i>E. coli</i>
제 2 위험군	사람에게 감염되었을 경우 증세가 심각하지 않고 예방 또는 치료가 비교적 용이한 질병을 일으킬 수 있는 생물체	<i>Vibrio cholerae</i> 장관 병원성 <i>E. coli</i> Hepatitis virus Measles virus
제 3 위험군	사람에게 감염되었을 경우 증세가 심각하거나 치명적일 수도 있으나 예방 또는 치료가 가능한 질병을 일으킬 수 있는 생물체	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Yersinia pestis</i> SARS virus Yellow fever virus
제 4 위험군	사람에게 감염되었을 경우 증세가 매우 심각하거나 치명적이며 예방 또는 치료가 어려운 질병을 일으킬 수 있는 생물체	Ebola virus Marburg virus Lassa virus Hendra-like virus

검사실 책임자는 작업자가 생물안전지침에 따라 작업을 수행하도록 교육하고, 실제 작업에서 이를 수행하는지 관찰하고, 에어로졸의 발생과 검사실내 획득감염을 최소화하기 위한 시설과 개인보호장구를 제공할 필요가 있다. 모든 검체와 배양된 균은 적합한 생물안전작업대 내에서 다루어져야 하고, 에어로졸이 발생할 수 있는 작업 시 검사자는 적합한 보호장구를 착용하고 생물안전작업대에서 시행해야 한다.

전통적으로 미생물 검사실의 생물안전 등급(biosafety level)은 1에서 4로 분류되는데 이런 일반적인 분류방식이 결핵검사실에 적용하기 부적절하거나 일선 검사자들이 이해하기 어려웠다. 이번에 새로 출간된 WHO 결핵검사실 안전매뉴얼에서는 결핵검사실을 저위험(low risk), 중등도위험(moderate risk), 고위험(high risk)로 구분하였는데 자세한 내용은 표 2에 요약하였다.

표 2. 위험도에 따른 결핵검사실의 분류

검사실의 위험단계	검사실 업무	위험도 평가
저위험 검사실(low risk)	직접 도말검사; Xpert MTB/RIF와 같은 자동 핵산증폭검사를 위한 검체 전처리	전염성이 있는 에어로졸 발생위험이 낮음. 전염성 물질의 농도가 낮음.
중등도위험 검사실(moderate risk)	배지 접종을 위한 검체 전처리; 직접 감수성검사	전염성이 있는 에어로졸 발생위험이 중등도임. 전염성 물질의 농도가 낮음.
고위험 검사실(high risk) (TB-containment laboratory)	배양된 균에 대한 균종동정; 배양된 분리균주를 이용한 감수성검사 혹은 신속내성검사	전염성이 있는 에어로졸 발생위험이 높음. 전염성 물질의 농도가 높음.

• 저위험 결핵검사실(Low-risk TB laboratories)

직접 도말검사를 시행하거나 Xpert MTB/RIF와 같은 자동 핵산증폭검사를 시행하는 검사실로서 결핵감염의 위험이 매우 낮다. 점성이 있는 객담을 바로 이용하기 때문에 에어로졸 발생이 적다. 작업공간은 검체 접수나 행정업무 공간과 분리되어야 하며 적절한 환기가 되는 곳에서는 생물안전작업대 밖에서도 검사 가능하다. 결핵검사실에 일반적으로 적용되는 환기기준을 따라야 하는데 시간당 6-12회 전체 공기를 순환시켜야 한다. 그러나 기계적인 공조시스템을 반드시 갖추는 필요는 없으며 자연환기도 적용 가능하다.

• 중등도위험 결핵검사실(Moderate-risk TB laboratories)

배양이나 직접 감수성검사를 위해서 검체를 처리하는 검사실을 의미하며, 도말양성검체로 신속내성검사를 시행할 수도 있다. 모든 작업은 생물안전작업대에서 시행해야 한다. WHO 매뉴얼에서는 생물안전작업대를 일

차 방어막으로 강조하고 있으며 검사실 환기 시스템을 이차 방어막으로 설명하고 있는데 단일방향의 공기흐름과 최소 시간당 6-12회 공기순환이 필요하다. 개인보호장비 착용이 필요한데 N95 마스크 착용은 필수적이지 않다.

• 고위험 결핵검사실(High-risk TB laboratories)

배양된 균을 이용하여 동정검사나 감수성검사를 시행하는 검사실이다. 많은 양의 결핵균을 다루고 균주 처리 과정에서 전염성 에어로졸 발생 가능성이 매우 높다. 고위험 결핵검사실은 반드시 고식적인 개념의 BSL-3 검사실을 의미하지는 않으며 결핵밀폐검사실(TB containment laboratory)이라고 설명하고 있다. 환기 시스템의 기준은 중등도위험 검사실과 동일하며 전실을 두게 되어 있다. 실험복, 장갑 및 N95 마스크 등의 개인보호장비를 반드시 착용해야 한다. 배양검사와 감수성검사를 시행하는 국내 대부분의 검사실은 WHO 기준에 의해 고위험 검사실로 분류되는데 실제 고위험 검사실의 요구사항을 충족하지 못하는 경우가 많아 개선이 필요하다.

2. 세부 절차

1. 시설, 장비, 개인보호장비 및 소독제

결핵균 검사를 위해서는 독립적인 검사 공간을 갖추는 것을 권장한다. 검사실의 출입구에는 생물재해(biohazard)에 대한 표시가 있어야 한다. 검사실 벽과 바닥은 닦기 쉽고 검사실에서 사용하는 화학물질이나 소독제가 흡수되지 않는 재질이어야 한다. 결핵검사실은 적절히 환기되어야 하며, 손을 씻을 수 있는 시설, 생물안전작업대, 안전한 원심분리기 등의 적절한 안전 시설과 장비를 구비하여야 한다.

1) 환기

- 결핵검사실에서는 공기흐름이 출입구 쪽에서 검사실 쪽으로 향하도록 공조시스템을 갖추어야 한다.
- 배양검사를 실시하는 검사실에서는 시간당 6-12회의 공기 순환이 일어날 수 있는 속도로 검사실 내 공기가 외부로 지속적으로 배출되는 환기 시스템을 갖추는 것을 권장한다(단, 국내 BSL-3 검사실 환기 기준은 시간당 10회 이상임).
- 검사실에서 배출되는 공기는 건물 외부로 배출되어야 한다.
- 환기 시스템은 적절히 작동하고 있는지 연 1회 이상 주기적인 점검을 받아야 한다.

2) 생물안전작업대(biological safety cabinet)

- 결핵균 검사를 위한 조작은 $0.3 \mu\text{m}$ 이상의 입자를 99.97% 이상 제거하는 HEPA (high efficiency particulate air) 필터가 장착된 생물안전작업대 안에서 실시하여야 한다.
- 생물안전작업대는 class II type을 권장한다.
- 생물안전작업대에서 배출되는 공기는 HEPA 필터를 통하여 여과되어야 한다.
- 생물안전작업대는 연 1회 이상 필터의 성능과 유속 등을 점검하여야 한다.
- 유속은 생물안전작업대 안으로 유입되는 공기의 속도로 class II A형은 0.38 m/sec, class II B형은 0.5 m/sec 이상이어야 한다.

3) 원심분리기

- 용기가 파열될 경우에 대비하여 원심분리기 내부 뚜껑도 구비되어 있어야 한다.
- 원심 분리기를 작동할 때는 균형을 적절하게 유지하여야 한다. 균형이 적절하지 않을 경우 용기가 파열될 가능성이 있다.

- 회전용기는 생물안전작업대로 옮겨서 열고 검체 용기가 파열되었을 경우 적절한 소독제로 충분히 소독한다.
- 원심분리기는 sodium hypochlorite 또는 다른 적절한 소독제를 이용해서 주기적으로 세척해야 한다.

4) 개인보호장비

- 감염의 가능성이 있는 검체, 배지 등을 취급할 때는 적절한 개인보호장비를 착용한다.
- 실험복은 가슴, 목 부위를 가릴 수 있어야 하고, 긴 소매여야 한다.
- 신발은 편안하고, 전체 발을 덮어야 한다. 액체를 흡수할 수 있는 운동화 등의 소재의 신발은 권장되지 않고, 이런 신발을 신을 때는 방수 신발 덮개를 사용한다. 신발의 재질은 가죽이나 합성가죽과 같이 방수가 되는 것이 권장된다.
- 검사시 항상 일회용 장갑을 착용한다.
- N95 마스크와 같이 1-5 μm 의 입자를 95% 이상 제거할 수 있는 마스크를 사용한다. 수술용 마스크는 에어로졸 차단 효과를 기대할 수 없으므로 사용해서는 안 된다. 생물안전작업대 안에서 작업할 경우도 마스크를 착용하여야 하고, 8시간 사용 후 폐기한다. 마스크를 착용할 때마다 마스크가 안면부에 잘 밀착되었는지 확인하여야 한다. 마스크를 착용한 후 양손으로 마스크를 전체적으로 감싸고 숨을 내쉬면서 코 주위와 마스크 가장자리에서 공기가 새는 곳이 있는지 확인한다.

5) 소독제

- 검사실에서 결핵균을 제거하기 위하여 사용하는 소독제로는 sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate, chlorine dioxide 등의 염소계 소독제와 에탄올, 프로판올 등의 알코올 소독제가 주로 사용되고, 그 외 glutaraldehyde, iodophor 등을 사용할 수 있다.
- 소독제는 희석하여 보관할 경우 활성이 감소할 수 있으므로 원액으로 보관하며, 필요할 때마다 희석하여 사용하는 것을 권장한다.
- 2% sodium hypochlorite, 70% 에탄올, 2% glutaraldehyde 등이 흔히 사용하는 소독제의 농도이다. Sodium hypochlorite의 경우 일반적인 소독에는 2% 용액(1:50 희석액)을 사용하고, 사고 및 유출 등의 광범위 오염이 발생한 경우에는 10% 용액(1:10 희석액)을 사용한다. Sodium dichloroisocyanurate는 분말이나 정제(tablet)로 이용되는데 사용과 보관이 간편하고 안정적이며 sodium hypochlorite에 비해 소독력이 강하다. Chlorine dioxide는 강력하고 빠르게 작용하는 소독제로서 유기물이 많은 경우에 사용하기 적합하다.
- 사용한 기구, 작업대 등은 적절한 소독제를 이용하여 소독한다.
- Sodium hypochlorite, 페놀, iodophor 소독은 결핵균을 사멸하기 위해서 15-30분이 필요한 것으로 알려져 있다. 소독제를 이용한 소독은 30분 이상 실시하는 것을 권장한다.

2. 검사 과정

결핵검사실 근무자는 취급하는 물질과 검사방법의 생물학적 위해성을 숙지하고, 유해성을 최소화 할 수 있는 적절한 방법으로 검사를 시행하여야 한다. 이를 위한 충분한 교육과 훈련이 있어야 한다.

1) 일반적 준수 사항

- 검사실 근무자는 안전작업 요령에 대한 사항을 충분히 숙지하여야 한다.
- 검사실 출입문은 닫아 두고, 허가 받은 사람만이 출입한다.
- 모든 조작은 에어로졸 발생을 최소한으로 할 수 있는 방법으로 실시한다(검체의 균질화와 오염제거, 원심분리, 피펫 작업, 백금이를 이용하는 경우 등에서 에어로졸이 발생할 수 있다).
- 피펫을 사용할 경우 피펫에이드를 이용한다.
- 검사실에서 음식물을 섭취하거나 화장을 해서는 안 된다.
- 검사실내에 음식물을 보관하지 않는다.
- 검사실에서 휴대전화를 사용하지 않는다.
- 장갑을 벗은 후에 손을 씻는다.
- 검사실에서는 항상 실험복을 착용하며 검사실을 나갈 경우 실험복을 탈의한다.

2) 생물안전작업대 사용시 준수 사항

- 생물안전작업대의 전원을 켜고 5분 이상 미리 가동시킨 후 작업을 시작한다.
- 생물안전작업대의 작동에 이상이 있는 경우는 사용하지 않고 점검하여야 한다.
- 작업은 생물안전작업대의 가운데 부분이나 뒤쪽에서 시행한다.
- 생물안전작업대 안에는 검사에 필요한 최소한의 물품만 놓아서 공기 흐름을 차단하는 것을 방지한다.
- 생물안전작업대의 그릴(grill)을 작업자의 팔이나 물건으로 막지 않는다.
- 생물안전작업대 공기 흐름에 영향을 주는 가스버너를 가능한 사용하지 않는다.
- 생물안전작업대에서 작업 중 손을 넣었다 빼는 행위는 공기 흐름에 영향을 주므로 최소화한다. 손을 뺄 경우 균을 다른 장갑을 벗고 새 장갑으로 교환한다.
- 생물안전작업대에서 작업 중 검사자 뒤로 다른 사람이 통행하는 것을 최소화한다.
- 업무가 종료된 후 작업 표면을 적절한 소독제로 세척한다.
- 생물안전작업대 안에서 자외선 살균을 할 경우 15분 이상 실시한다.

3) 검체 운송과 처리

- 검체는 수송 도중 누출을 막기 위한 안전한 뚜껑이 있는 용기에 넣는다.
- 육안 상 오염의 가능성이 있거나, 용기가 파손되거나 새는 경우에는 새로운 검체를 요청한다.
- 검체를 원심분리하는 경우 나사마개(screw cap)가 있는 용기를 이용한다.
- 원심분리한 검체용기는 생물안전작업대 안에서 개봉하고, 필요한 조작을 마친 후에는 즉시 마개를 닫는다.
- 보텍스 교반기를 이용하여 혼합을 한 경우 10분 이상 세워둔 후 마개를 연다.

4) 항산균 도말검사

- 에어로졸이 발생할 수 있는 모든 조작은 생물안전작업대 안에서 실시한다.
- 원심분리한 경우 시험관을 10분 이상 세워둔 후 마개를 연다.
- 완전히 건조되지 않은 슬라이드를 옮기거나, 고정하지 않는다.
- 슬라이드 고정은 화염을 이용하는 것보다 가온기(slide warmer)를 이용하는 것을 권장한다.
- 5% sodium hypochlorite로 검체를 처리한 경우에는 생물안전작업대 밖에서 취급할 수 있다. 검체는 동량의 5% sodium hypochlorite 용액과 혼합하여 15분 이상 처리한다.

5) 배양, 동정 및 약제감수성 검사

- 모든 조작은 생물안전작업대 안에서 실시한다.
- 배양된 결핵균을 백금으로 취급할 경우 에어로졸의 발생을 최소화 하도록 주의한다.
- 배양된 결핵균을 취급한 백금을 바로 가열할 경우 생물안전작업대 안에 결핵균이 퍼질 수 있다. 따라서 70% 에탄올과 세척한 모래를 담은 용기에, 백금을 넣어서 세척한 후 꺼내서 가열한다. 모래 세척을 통하여 백금이에 묻어 있던 결핵균이 대부분 제거되고, 백금이에 남아 있는 잔여물은 에탄올의 효과로 빠르게 소각된다.
- 피펫을 이용하는 경우 액체가 강하게 배출되지 않도록 주의하고, 여러 번 파이펫팅을 반복해서 시행하지 않는다.
- 액체배지 시험관에 생긴 기포막을 터뜨리지 않도록 주의한다.

6) 폐기물 처리

- 결핵균에 오염되었을 가능성이 있는 폐기물은 polypropylene 등 고압 멸균할 수 있는 봉투에 넣어서 고압 멸균한 후 의료폐기물로 처리한다.



- 주사바늘 깨진 유리 등 날카로운 폐기물은 찢어지지 않는 용기에 넣은 후 폐기용 봉투에 넣는다.
- 폐기에 사용된 용기, 봉투 등은 재사용하지 않는다.
- 생물안전작업대 안에서 검사한 폐기물을 고압 멸균할 수 있는 봉투에 넣고, 밀봉한 후 생물안전작업대 밖으로 꺼낸다.
- 고압증기멸균기는 외부의 검사실 외부의 오염 위험성을 최소화하기 위하여 결핵 검사실 내부 또는 결핵 검사실과 직접 연결된 공간에 배치하는 것이 권장된다.

7) 사고 및 유출

결핵균이 포함되어 있을 가능성이 있는 물질이 유출되었을 경우에 대비하여 유출 키트(spill kit)를 준비한다. 유출 키트는 희석된 살균제, 의료폐기물 전용 용기, 흡수용 물질(종이 타월 등), 개인보호장비, 핀셋 등으로 구성한다.

(1) 결핵균에 오염되었을 가능성이 있는 물질이 생물안전작업대 밖에서 유출된 경우 다음 절차를 시행한다.

- 모든 실험자는 에어로졸이 사라질 때까지 최소 1시간 대피해야 한다.
- 적절한 개인보호장비를 착용한다.
- 유출된 물질과 그 주변지역을 종이타월로 덮는다.
- 종이타월에 소독제를 붓고, 30분간 기다린다.
- 종이 타월을 폐기용 봉투에 넣고, 깨진 유리 용기 등이 있으면 폐기용 용기에 넣는다.
- 유출 지역에 소독제를 다시 붓고 10분간 기다린다.
- 유출된 물질과 접촉했을 가능성이 있는 모든 물건은 소독한다.
- 검사실 바닥과 실험대를 소독한다.

(2) 결핵균에 오염되었을 가능성이 있는 물질이 생물안전작업대 안에서 유출된 경우 다음 절차를 시행한다.

- 유출된 물질을 종이타월로 덮는다.
- 종이타월에 소독제를 붓고, 30분간 기다린다.
- 종이 타월을 폐기용 봉투에 넣고, 깨진 유리 용기 등이 있으면 폐기용 용기에 넣는다.
- 생물안전작업대 안에 있는 물품과 생물안전작업대의 작업 표면과 벽면을 소독한다.

3. 검사자의 건강 검진

1) 채용 전 건강 검진

결핵검사실에 처음 근무하는 직원의 경우 흉부방사선검사 등 결핵 검사를 실시하며, 잠복결핵을 진단하기 위해서 투베르쿨린 검사 또는 인터페론감마 분비검사를 시행하여야 한다. 투베르쿨린 검사를 시행할 경우 과거 감염 여부를 확인하기 위해 2단계 시험을 권장한다. 즉, 1차 검사에서 음성일 경우 1-3주 이내에 2차 검사를 실시한다. 과거 결핵감염이 있을 경우 면역강화현상에 의해서 양성 결과를 보이게 된다. 2차 검사에서도 음성인 경우 결핵감염이 없다고 판단한다.

2) 정기적 신체 검사

결핵검사실에 근무하는 직원을 대상으로 주기적으로 건강 상태에 대한 조사가 필요하다. 1년에 한 번 흉부방사선검사와 잠복결핵을 진단할 수 있는 검사를 실시한다. 채용 전 검진에서 시행한 잠복결핵 진단법과 동일한 검사법으로 추후 검사를 시행한다.

3) 노출 후 감염 조사

결핵균에 노출된 사건이 발생한 경우 적절한 임상적인 조사를 실시한다. 노출 8주 후 흉부방사선검사를 실시하고, 잠복결핵을 진단할 수 있는 검사를 실시한다.

4) 유증상자 발견 및 진료

결핵검사실에 근무하는 직원은 2주 이상 지속된 기침, 체중 감소, 흉통, 식욕부진, 수면 중 발한 등 결핵증상을 숙지하고 있어야 하고, 이런 증상이 발생할 경우 즉시 적절한 진료를 받을 수 있어야 한다.

참고문헌

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical Laboratory Safety; Approved Guideline-2nd ed. CLSI document GP17-A2. Wayne, PA; CLSI, 2004.
2. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. WHO/TB/98.258. World Health Organization, 1998.
3. World Health Organization. Guidelines for the prevention of tuberculosis in health care



- facilities in resource-limited settings WHO/TB/99.269. World Health Organization, 1999.
4. World Health Organization. Laboratory biosafety manual, 3rd ed. WHO/CDS/LYO/2004.11 World Health Organization, 2004.
 5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
 6. 질병관리본부 국립보건연구원. 실험실생물안전지침(National Guideline for Laboratory Biosafety Manual), 2006.
 7. World Health Organization. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. World Health Organization, 2012.



그림 1. 생물안전작업대(Class II A2 type).



그림 2. N95 호흡기(3M 9322K 모델).



그림 3. N95 호흡기 착용모습(3M 9322K 모델).



그림 4. 호흡기 밀착도 검사(Respirator fit test).



그림 5. 알코올 모래(alcohol sand).



그림 6. Swing bucket 형태의 원심분리기.

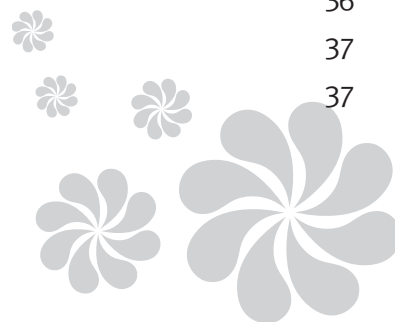


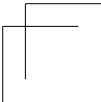
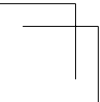
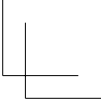
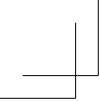
그림 7. 검사를 위해서 생물안전작업대로 옮겨진 원심분리기 회전용기(bucket).

II. 검체 전처리

결핵검사지침

1. 가이드라인	25
1.1. 검체 채취 및 보관	25
1.2. 검체 전처리의 원리	27
1.3. 정도관리	29
2. 검사절차	30
2.1. 검체 전처리 전 단계	30
2.2. 검체 채취, 운반 및 보관	30
2.3. 장비 및 기구	30
2.4. 재료 및 시약	30
2.5. 정도관리	34
3. 검체 전처리법	35
3.1. NALC-NaOH법	35
3.2. NaOH법	35
3.3. Z-TSP법	36
3.4. Oxalic acid법	37
3.5. CPC-NaCl법	37





II. 검체 전처리

1. 가이드라인

1. 검체 채취 및 보관

전체 결핵의 80% 정도가 호흡기 결핵이므로 검사실에서 가장 흔히 처리하는 검체가 객담 등의 호흡기 검체다. 이외에 소변, 위액흡인검체, 조직, 생검검체, 체액 등이 결핵검사를 위해 의뢰된다. 면역기능이 저하된 환자에서 항산균 질환을 진단하기 위해서는 혈액 또는 대변검체가 도움이 될 수 있다. 일반적으로 결핵검사를 위한 검체는 운송배지나 보존제가 필요 없으나, 크기가 작은 생검검체의 경우에는 소량의 무균생리식염수에 담아 운송할 수 있다. 면봉검체(swab)는 항산균의 배양에 부적절한데, 이는 면봉검체의 경우 검체량이 적을 뿐 아니라 항산균의 소수성(hydrophobicity) 때문에 항산균이 면봉에 달라붙어 이를 배지로 옮기기 어렵기 때문이다. 객담이나 소변의 경우 일반적으로 2-3일간 하루에 1번씩 반복 채취함을 통해 양성률을 높일 수 있다. 혈액, 뇌척수액, 골수검체는 실온보관하며, 그 이외의 검체는 검체의 운송이 1시간 이상 지체되는 경우에 4°C에서 냉장보관하며, 검사실에서도 전처리 전까지 검체를 냉장보관 하여야 한다.

1) 객담

원칙적으로 아침 첫 객담을 2-3일 동안 연속적으로 얻는 것이 좋다. 여러 차례 객담을 받아서 모은 검체(pooled sputum)는 배양오염을 증가시킬 수 있어 부적절하다.

2) 기관지흡인검체 및 폐생검검체 등

기관지경에 의한 교차오염을 방지하기 위한 주의가 필요하며, 환경에 존재하는 비결핵항산균 오염을 방지하기 위해 일련의 검체 채취 과정에서 수도물을 사용하지 않아야 한다.

3) 위액세척검체

객담을 뱉을 수 없는 유소아 결핵검사를 위해 필요하며, 이른 아침에 금식상태에서 채취하는 것이 좋다. 5-10 mL의 검체를 2-3일 동안 연속적으로 채취하고 검체는 실온에 보관한다. 가능하면 빨리 검체 전처리를 해야 하는데 위산으로 인해 결핵균이 쉽게 사멸하기 때문이다. 4시간 안에 전처리할 수 없다면 탄산나트륨(sodium carbonate) 100 mg을 검체에 첨가하여 중화시킨다.

4) 소변

아침 첫 중간뇨를 2-3일 연속으로 멸균된 용기에 채취한다. 밤사이 환자 방광 내 소변이 농축되어 균농도가 높아지므로 아침 첫 소변을 채취하는 것이 정확한 검사를 위해 중요하다. 최소한 40 mL의 소변이 필요하며, 24 시간 소변 또는 소량의 소변은 부적절한 검체이다. 도관을 이용한 채뇨는 중간뇨를 얻을 수 없는 경우에만 제한적으로 사용되어야 한다.

5) 체액

가능한 한 많은 양의 검체를 무균적으로 채취하는 것이 원칙이다. 혈액이 포함된 경우 SPS (sodium polyanethol sulfonate)와 같은 항응고제를 첨가할 수 있다. 뇌척수액의 경우 검체 내 항산균 수가 매우 적을 수 있으므로 최소 5 mL가 필요하다. 체액을 적신 면봉은 검체로 부적절하다.

6) 조직, 농 등

포르말린에 담긴 검체로는 항산균 도말과 배양을 시행할 수 없다. 조직검체 운송 시 2-3 mL 생리식염수를 첨가하여 운반할 수 있으나 거즈에 싸서 운반해서는 안 된다. 농검체의 경우 면봉검체는 권장되지 않으며 조직이나 액체상태로 의뢰해야 한다. 조직 및 농 등의 검체에서 낮은 온도에서 잘 성장하는 *Mycobacterium marinum* 이나 *Mycobacterium chelonae* 등에 의한 감염이 의심되면 30°C에서의 배양을 추가하는 것을 고려한다.

7) 혈액

SPS, heparin, 혹은 citrate 등의 항응고제를 사용하여 채취하며 EDTA 튜브에 담긴 검체, 일반 세균배양용 혈액배양병에 담긴 검체, 응고된 검체는 부적절하다. 고체배지에 직접 접종하는 것은 추천되지 않으며 혈액이 많이 포함된 검체에서 항산균을 배양하고자 할 경우 BACTEC Myco/F Lytic 배지나 bioMérieux MB bottle를 사용하는 것이 권장된다.

8) 대변

후천성면역결핍증 환자에서 MAC (*Mycobacterium avium* complex)을 검출하기 위한 목적 이외에는 항산균을 검출하기 위한 대변 배양은 권장되지 않는다. 배양에는 1g을 넘는 충분한 검체량이 필요하다. 전처리 되지 않은 대변을 먼저 직접 도말하여 항산균이 검출되는 경우에만 대변의 항산균 배양을 시행하라는 과거의 지침은 더 이상 권장되지 않는데, 이는 대변에 대한 항산균 도말검사의 민감도가 단지 32-34%에 그치기 때문이다.

9) 부적절한 검체

- 검체량이 너무 소량일 때
- 객담이 아닌 타액으로 구성된 검체
- 마른 면봉검체(dried swabs)
- 여러 검체를 하나로 모아 만든 객담 또는 소변
- 검체 용기가 파손되거나 라벨이 없는 경우
- 검체 채취와 전처리 사이 간격이 7일을 넘는 경우

검체가 검사에 부적절하더라도, 용기파손이나 라벨이 없는 경우를 제외하면 가급적 검사는 진행하되 부적절한 검체를 이용하였다는 것을 임상에 알리도록 한다.

2. 검체 전처리의 원리

정상적으로 무균상태인 부위의 조직(림프절, 폐생검 등)과 천자흡인액(척수액, 관절액, 흉수 등) 등은 전처리 없이 바로 배지에 접종할 수 있다. 하지만, 대장생검조직, 농성삼출액, 혼탁한 체액 등은 전처리 과정을 거치는 것이 검출률을 높인다. 조직검체는 멸균된 생리식염수 또는 0.2% bovine serum albumin을 이용하여 파쇄한 후에 검사를 진행한다. 체액은 일반적으로 적은 수의 항산균만을 포함하고 있어 검사 전에 농축되어야 하므로 $3,000 \times g$ 이상에서 15분 동안 원심분리한 후에 얻어진 침전물로 검사를 시행한다. 만약 해당 검체에 대해 오염제거를 시행해야 할지 명확하지 않다면, 초콜렛 배지(chocolate agar plate)에 접종하여 무균상태를 확인하거나, 동시에 의뢰된 일반미생물배양검사의 결과가 나올 때까지 검체를 냉장보관한 후 그 결과에 따라 판단한다.

오염된 부위에서 얻어진 검체(객담 등)의 경우에는 오염을 제거하기 위하여 균질화와 오염제거과정이 필요하다. 일반적으로 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH) 및 N-acetyl-L-cysteine (NALC)를 이용하여 검체의 전처리를 수행한다. 점액소(mucin)는 항산균 검출을 어렵게 하며, 오염세균에 대한 오염제거제의 성능을 떨어뜨린다. 그러므로 점액소와 세포속에 들어있는 항산균을 노출시키고, 오염균을 줄이거나 제거하기 위한 액화과정이 필요하다. 고농도의 NaOH는 액화와 오염제거 효과는 있으나 오염균 이외에 항산균에도 영향을 미칠 수

있으므로 NALC를 추가하여 객담의 점액을 녹인 후 NaOH로 효과적인 오염제거가 이루어지도록 하는 것이 바람직하다. 오염제거제의 농도를 낮추면 결핵균의 배양 양성률이 높아지지만, 배지 오염률도 높아진다. 강알칼리일수록, 처리온도가 높을수록, 살균력은 오염균과 항산균 모두에 대해 더 강력해진다. 오염제거를 심하게 할 경우 임상검체에서 20-90%의 항산균이 사멸할 수 있어 주의를 요한다.

효과적인 객담 액화제로는 NALC, dithiothreitol, 효소 등이 있다. 액화제는 세균을 직접적으로 억제하지는 못한다. 그러나 액화제의 사용은 NaOH의 농도를 낮출 수 있게 하여, 간접적으로 항산균의 검출률을 향상시킨다. NaOH의 적정 농도는 각 검사실의 오염률에 따라 결정된다. 검체가 심각하게 오염된 경우에는 NaOH농도를 높일 수 있으나 NaOH의 최종농도가 5-6%를 초과하지 않도록 한다. 가장 널리 사용되는 액화 및 오염제거법은 NALC-2% NaOH 방법이다. C18-carboxypropylbetaine 법을 이용할 경우 배양 및 도말의 민감도가 NALC-NaOH 방법에 비해 의미 있게 향상되었지만 오염률이 과도하게 높았다. Cystic fibrosis 환자의 경우 호흡기 검체의 80%에서 *Pseudomonas aeruginosa*가 검출되므로 chlorhexidine 방법이 NALC-NaOH 방법에 비해 비결핵항산균 양성률을 두 배 더 높였다. 액체배지에 사용되는 PANTA (polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, azlocillin)는 이차적인 오염을 줄일 수 있다. 그 외에 전처리 방법은 임상검사실에서 흔하게 사용되지는 않는다. *Pseudomonas* 균종에 의해 지속적으로 오염이 발생한 검체를 처리하기 위해서 옥살산 법이 도움이 될 수 있다. Zephiran-trisodium phosphate (Z-TSP)법은 약한 전처리법으로 항산균의 zephiran 저항성으로 인해 전처리 시간에 영향을 덜 받는 장점이 있다. 그러나 잔존 Z-TSP에 의해 항산균의 성장이 저해될 수 있으므로 주의해야 한다. 한천배지에 접종할 경우 중화과정이 필요하지만 계란배지에 접종할 경우에는 계란의 lecithin이 중화제 역할을 하므로 바로 접종이 가능하다. Cetylpyridinium chloride (CPC) 법은 검체를 냉장보관하지 못하거나 운송기간이 길 경우에 유용하다. 1% CPC-2% NaCl 용액은 효과적으로 검체의 오염을 제거하고 액화시킬 수 있으며 결핵균이 장기간 생존할 수 있다. 그러나 낮은 온도에서 CPC가 결정을 형성할 수 있어 주의를 요한다.

각 오염제거방법의 효능을 확인하기 위해서는 4-6개의 오염이 제거된 객담을 혈액한천배지에 접종하여 35°C에서 48시간 동안 배양한 후 오염균 증식이 거의 억제되거나 존재하지 않음을 확인한다.

액화를 위해 진탕할 때는 검체가 튜브 뚜껑에 닿을 정도로 강력해서는 안 된다. 진탕 후에는 에어로졸이 가라앉도록, 용기의 뚜껑을 열기 전에 적어도 15분 정도 기다려야 한다. 효과적인 검체 집균을 위해서는 $3,000 \times g$ 이상의 원심력에서 최소 15분 이상 원심분리를 시행한다. 분당회전수(rpm)에 따른 원심력(g)은 각각의 원심분리기의 반지름마다 다르므로 작업절차를 규정할 때는 원심력 단위를 이용하여야 한다.

$$RCF = 1.12 \times R_{\max} \times \left(\frac{rpm}{1,000} \right)^2$$

원심분리가 수행되는 동안 검체의 온도는 20°C 이하로 유지되어야 하므로 냉장원심분리가 필요하다.

3. 정도관리

호흡기 검체의 경우 적절한 전처리 과정을 시행한다 하여도 2-5%에서 정상 상재균에 의해 오염이 발생하는 것이 일반적이다. 오염률이 2%보다 낮으면 오염제거과정이 항산균 자체에도 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다. 특정 검사실에서 일정기간 동안의 오염률이 5%를 넘는다면 오염제거과정에 대한 점검이 필요하며 경우에 따라 NaOH 농도를 증가시킬 수 있다. 최근 액체배지의 광범위한 사용이 에어로졸의 발생을 증가시키며 그 결과 검체간 교차오염의 위험도가 증가할 수 있음을 주의해야 한다.

2. 검사절차

1. 검체 전처리 전 단계

임상검체는 항산균의 검출률을 높이기 위해 전처리를 거쳐야 하는데 전처리에는 1) 검체에 포함된 유기물을 액화시키기 위한 균질화 과정과, 2) 오염되어 있는 균을 제거하는 오염제거 과정이 있다. 오염제거 과정은 항산균도 억제하므로 전처리방법의 특성을 숙지한 후 검사를 진행하여야 한다.

2. 검체 채취, 운반 및 보관

- 가이드라인 참조

3. 장비 및 기구

- 원심분리기 (에어로졸이 새지 않도록 밀폐 설계된 원심분리기를 사용하여야 한다.)
- 생물안전작업대(Class II type)
- 보텍스 교반기(vortex mixer)

4. 재료 및 시약

1) NALC-NaOH법

(1) NaOH-sodium citrate 저장용액(stock solution)

[용액 1 제조]

- 구연산나트륨 다수화물(sodium citrate dihydrate) 29 g
- 또는 구연산나트륨 무수물(sodium citrate, anhydrous) 26 g
- 증류수 1,000 mL가 되게 채울 것

[용액 2: 4% NaOH 용액 제조]

- NaOH 40 g
- 증류수 1,000 mL가 되게 채울 것

- 동량의 용액 1과 2를 섞은 후, 나사마개뚜껑이 달린 플라스크에 넣어 121°C에서 15분간 고압멸균을 한다.
- 완성된 용액은 실온에서 보관할 수도 있으나 가급적 냉장보관하는 것을 권장한다.
- NaOH는 부식성이 있으므로 취급할 때 적절한 보호장구와 안구보호대를 착용하여야 한다.

(2) NALC-NaOH 작업용액(working solution)

사용하기 직전에 NALC와 NaOH-sodium citrate 용액을 아래의 표와 같은 비율로 혼합한다. 작업용액은 검사할 때마다 매일 새로 제조하여 사용하여야 하며, 하루가 지나면 폐기한다.

표 1. NALC-NaOH 용액 제조법

검사에 필요한 양(mL)	필요한 양	
	NaOH-sodium citrate (mL)	NALC (g)
50	50	0.25
100	100	0.50
250	250	1.25
500	500	2.50
1,000	1,000	5.00

(3) 0.067 M 인산완충액(pH 6.8)

- 염기성 완충액: Na_2HPO_4 (anhydrous) 9.47 g을 용기에 넣고 1,000 mL가 될 때까지 증류수를 채운다.
- 산성 완충액: KH_2PO_4 9.07 g을 용기에 넣고 1,000 mL가 될 때까지 증류수를 채운다.
- 염기성 완충액과 산성 완충액을 동량 혼합한다.
- pH측정기로 pH를 확인한 후 목표 pH에 도달할 때까지 산성 또는 염기성 완충액을 첨가하여 조정한다.
- 염기성 혹은 산성 완충액을 나사마개 용기에 담아 121°C에서 15분간 고압멸균을 한 후 나중에 사용하거나, 혼합한 후 고압멸균을 시행한다.
- 제조된 인산완충액은 냉장보관하는 것을 권장한다.

(4) Bovine serum albumin V분획 용액(0.2%)

- NaCl 0.85 g을 증류수 100 mL에 녹인다.
- Bovine serum albumin V분획 2 g 넣은 후 젓거나 가볍게 흔들어 녹인다.
- 4% NaOH를 첨가하여 pH를 6.8로 맞춘다.
- 완성된 용액을 0.45 μm 구경의 필터로 여과하여 멸균한다.

- 2% bovine serum albumin 용액을 멸균된 나사마개 튜브에 분주한 후 냉장보관한다.
- 검사 시 2% bovine serum albumin 용액과 멸균 생리식염수(또는 멸균 증류수)를 1:10의 비율로 희석하여 0.2% 알부민 용액을 제조한다.
- 하루에 필요한 만큼의 만들어 사용하며 남은 작업용액은 폐기한다.

(5) 멸균 생리식염수 또는 멸균 증류수

2) NaOH법(Sodium hydroxide method)

(1) 2% NaOH 용액

- NaOH 20 g을 용량표시가 있는 플라스크에 넣는다.
- 전체가 1,000 mL가 되도록 증류수로 채운다.
- 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 사용한다.

(2) 4% NaOH 용액

- NaOH 40 g을 용량표시가 있는 플라스크에 넣는다.
- 전체가 1,000 mL가 되도록 증류수를 채운다.
- 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 사용한다.

(3) 0.067 M 인산완충액(0.067 M phosphate buffer (pH 6.8))

- 제조방법: NALC-NaOH법 참조

(4) 2 N HCl 용액

- 증류수 100 mL를 플라스크에 붓는다.
- HCl (약 12 N 혹은 36%) 33 mL를 플라스크 벽면을 따라 조심스럽게 넣는다.
- 증류수를 200 mL가 될 때까지 채운다.
- 121°C에서 15분간 멸균한 후 사용하며 실온에서 보관할 수 있다.
- 주의사항
 - 작업 전에 내산성 보호장구(앞치마, 장갑, 안구보호대 등)를 착용하여야 한다.
 - 강한 반응이 일어나거나 염산이 될 우려가 있으므로 절대 물을 염산에 붓지 않는다.

(5) Phenol red 지시약

- Phenol red 분말 8 mg을 4% NaOH 20 mL에 섞는다.
- 자석교반기를 이용하여 녹이며 잘 녹지 않을 경우 열을 약간 가한다.
- Phenol red 분말이 녹으면 1 L 플라스크에 옮기고 증류수를 1 L 측정눈금까지 붓는다.
- 제조된 용액은 실온에서 보관할 수 있다.

3) Zephiran-trisodium phosphate (Z-TSP)법**(1) Z-TSP 시약**

- $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1 kg을 더운 증류수 4 L에 녹인다.
- Zephiran (17% benzalkonium chloride) 7.5 mL를 첨가한다.
- 잘 섞은 후 실온에 보관한다.

(2) 중화 완충액(Neutralizing buffer)

- Bacto neutralizing buffer, dehydrated (Difco) 5.2 g을 용기에 넣고 전체 1,000 mL가 되도록 증류수를 채운다.
- 자석교반기를 이용하여 녹이며 잘 안 녹을 경우 약간의 열을 가한다.
- 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 냉장보관한다.

4) Oxalic acid법**(1) 5% Oxalic acid 용액**

- Oxalic acid ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 50 g을 용기에 넣고 전체 1,000 mL가 되도록 증류수를 채운다.
- 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 실온 보관한다.

(2) Phenol red 지시약

- 제조방법: NaOH법 참조

(3) 4% NaOH 용액

- 제조방법: NaOH법 참조

(4) 멸균 생리식염수

5) Cetylpyridinium chloride (CPC)-NaCl법

(1) CPC-NaCl 시약

- CPC 10 g과 NaCl 20 g을 용기에 넣고 전체 1,000 mL가 되도록 증류수를 채운다.
- 자석교반기를 이용하여 녹이며 잘 녹지 않을 경우 약하게 열을 가한다.
- 제조된 용액은 멸균할 필요가 없으며 장기간 안정하므로 실온에 보존한다.
- 보관 시 광선이나 열, 증발에 주의하며, 결정체가 생겼을 경우에는 약하게 가열해서 다시 녹인다.

(2) 중화 완충액(Neutralizing buffer)

- 제조방법: Z-TSP법 참조

(3) 멸균 생리식염수

5. 정도관리

오염이 발생한 검체의 비율을 꾸준히 감시해야 한다. 일반적으로 항균제가 들어 있지 않은 고체배지를 이용한 경우 호흡기 검체의 오염률은 2-5%를 허용범위로 한다. 항균제가 들어 있지 않은 배지에서 오염률이 2%보다 유의하게 낮은 경우에는 오염제거가 너무 과한 것을 의미하며, 5% 이상의 오염률은 오염제거나 균질화과정이 불충분했다는 것을 의미한다.

오염제거제의 lot번호가 바뀐 경우, 4-6개의 객담 검체를 오염제거한 후 원심분리하여 집균시킨 다음 일반세균 배양용 배지에 접종한다. 37°C에서 1-2일간 배양했을 때 오염균이 거의 없거나 전혀 자라지 않아야 한다.

3. 검체 전처리법

1. NALC-NaOH법

- 1) 검체와 동량의 NALC-NaOH 용액을 첨가한다. 검체의 양이 10 mL를 넘으면 멸균된 피펫을 이용하여 가장 화농이 심하고 피가 섞여있는 부분이나, 가장 점액질인 부분을 10 mL 옮긴다. 이후 뚜껑을 잘 닫는다.
- 2) 보텍스 교반기로 내용물을 잘 섞되 30초를 넘기지 않는다.
- 3) 오염제거를 위해 튜브를 실온에서 15분간 놓아둔다.
- 4) 증류수나 멸균된 0.067 M 인산완충액(pH 6.8)을 50 mL 눈금까지 채운다. 이렇게 완충액을 넣음으로써 NaOH의 작용과 검체의 점도를 감소시킬 수 있다.
- 5) 뚜껑을 다시 꼭 닫은 후 몇 차례 뒤집어서 섞어준다.
- 6) 튜브를 $\geq 3,000 \times g$ 에서 15-20분간 원심시킨다. 이때 에어로졸이 새어 나오지 않도록 밀폐설계된 원심 분리기를 사용하여야 한다.
- 7) 상층액을 소독제가 담긴 폐기용기에 따라 버린다.
- 8) 멸균된 직경 3 mm 미생물검사용 루프로 침사의 일부를 취한다. 깨끗한 새 슬라이드에 침사를 1×2 cm 넓이로 도달하는데, 침사의 양이 매우 적은 경우에는 0.2% bovine serum albumin V분획을 첨가한 후 도달하는 것이 좋다.
- 9) 남은 침사를 1-2 mL의 멸균 증류수나 멸균 인산완충액에 부유시킨 후 즉시 배지에 접종한다.
- 10) 멸균된 일회용 피펫으로 적당한 액체 및 고체배지에 검체를 접종한다. 고체배지의 경우는 100-200 μ L를 접종하며, 상품화된 액체배지의 경우는 제조사의 지침에 따른다.
- 11) 남은 침사는 필요한 경우를 대비하여 냉장하여 보관할 수 있다.

2. NaOH법

- 1) 검체용기에 검체와 동량의 4% NaOH 용액을 넣는다. 10 mL 이상의 검체가 도착하는 경우에는 멸균된 피펫을 이용하여 가장 화농이 심하거나, 피가 섞인 부분 또는 가장 점액성인 부분을 골라 사용한다.
- 2) 검체의 균질화와 오염제거를 위해 필요한 가장 낮은 농도의 NaOH 용액을 사용해야 한다. 만약 2% NaOH로 처리하였을 때 오염률이 너무 높다면 NaOH 용액 노출시간을 늘리기보다는 농도를 3-4%로 조정하도록 한다.
- 3) 보텍스 교반기를 이용해 용기의 내용물을 잘 혼합한 후 오염제거를 위해 실온에서 15분간 둔다.

- 4) 멸균 증류수나 멸균 인산완충액을 용기의 50 mL 표시까지 붓는다. 이 과정을 통해 NaOH의 작용과 검체의 점도가 감소한다.
- 5) 용기의 뚜껑을 잘 닫은 후 수 차례 상하로 뒤집으며 내용물을 섞는다.
- 6) $\geq 3,000 \times g$ 에서 15-20분간 원심분리를 시행한다. 원심분리기의 내부에는 비말이 날리지 않게 밀봉된 원심분리용 컵을 사용하여야 한다.
- 7) 원심분리가 끝난 후 상층액은 살균소독제가 채워진 용기에 버린다.
- 8) 침사의 산도를 phenol red 지시약으로 검사해 볼 수도 있다. 이때는 침사가 적색에서 노란색으로 변할 때까지 2 N 염산을 한 방울씩 떨어뜨려 중화시킨다.
- 9) 3 mm 직경의 미생물용 루프로 침사의 일부를 취하여 새 유리 슬라이드에 1 × 2 cm 넓이로 도말한다. 침사의 양이 매우 적은 경우에는 0.2% bovine serum albumin을 첨가한 후에 도말을 만든다.
- 10) 남은 침사를 1-2 mL의 멸균 증류수나 멸균 인산완충액에 부유시킨 후 배지에 접종한다.

3. Z-TSP법

- 1) 검체와 동량의 Z-TSP 용액을 첨가한다. 10 mL 이상의 검체가 의뢰된 경우 멸균 피펫을 이용하여 가장 화농이 심하거나, 피가 섞인 부분 또는 가장 점액성인 부분을 골라 사용한다.
- 2) 기계식 진탕기(mechanical shaker)를 이용하여 30분간 잘 섞는다.
- 3) 검체 용기를 진탕시키지 않는 상태로 실온에 20-30분간 방치한다.
- 4) $\geq 3,000 \times g$ 에서 15-20분간 원심분리를 시행한다. 원심분리기의 내부에는 비말이 날리지 않게 밀봉된 원심분리용 컵을 사용하여야 한다.
- 5) 원심분리가 끝난 후 상층액을 살균소독제가 채워진 용기에 버린다.
- 6) 침사를 20 mL의 pH 6.6 중화완충액에 부유시킨 후 보텍스 교반기로 30초간 잘 섞어준다.
- 7) 부유액을 $\geq 3,000 \times g$ 에서 15-20분간 원심분리한다.
- 8) 대부분의 상층액을 따라 버리고 소량의 상층액을 남겨두어 침사를 다시 부유시킨다. 완충액은 남아있는 제피란-삼나트륨인산염을 중화시키는데, 특히 한천배지에 접종할 경우 매우 중요하다.
- 9) 멸균된 3 mm 직경의 미생물용 루프로 침사 일부를 떼어내어 새 유리 슬라이드에 1 × 2 cm 넓이로 도말한다.
- 10) 부유액을 적절한 배지에 접종한다.

4. Oxalic acid법

- 1) 검체와 동량의 5% Oxalic acid 용액을 첨가한다. 10 mL 이상의 검체가 도착하는 경우에는 멸균된 피펫을 이용하여 가장 화농이 심하거나, 피가 섞인 부분 또는 가장 점액성인 부분을 골라 사용한다.
- 2) 보텍스 교반기로 30초간 잘 섞는다.
- 3) 실온에서 20-30분간 용기를 방치하여 오염을 제거한다. 가끔 용기를 흔들어 준다.
- 4) 용기의 50 mL 표시 눈금까지 멸균 생리식염수를 붓는다.
- 5) 뚜껑을 단단히 닫은 후 몇 차례 뒤집어 섞는다.
- 6) $\geq 3,000 \times g$ 로 15-20분간 원심분리를 시행한다. 원심분리기의 내부에는 비말이 날리지 않게 밀봉된 원심분리용 컵을 사용하여야 한다.
- 7) 원심분리가 끝난 후 상층액을 살균소독제가 채워진 용기에 따라 버린다.
- 8) 침사에 페놀레드 지시약을 몇 방울 떨어뜨린다.
- 9) 침사가 열린 분홍색이 될 때까지 4% NaOH 용액으로 중화시킨다.
- 10) 멸균된 3 mm 직경의 미생물용 루프로 침사의 일부를 떼어내어 새 유리 슬라이드에 1 × 2 cm 넓이로 도말한다.
- 11) 침사를 다시 부유시킨 후 부유액을 적절한 배지에 접종한다.

5. CPC-NaCl법

- 1) 검체와 동량의 CPC-NaCl 시약을 첨가한다. 10 mL 이상의 검체가 도착하는 경우에는 멸균된 피펫을 이용하여 가장 화농이 심하거나, 피가 섞인 부분 또는 가장 점액성인 부분을 골라 사용한다.
- 2) 검체가 액화될 때까지 손으로 흔든다.
- 3) 검체 운송규정에 따라 용기를 포장한 후 검사실로 운송한다. 검체 균질화와 오염제거에는 최소한 24시간이 필요하다.
- 4) 검체용기에 멸균증류수나 중화완충액을 50 mL 눈금까지 채운다.
- 5) 뚜껑을 꼭 닫은 후 몇 차례 뒤집어 섞는다.
- 6) $\geq 3,000 \times g$ 로 15-20분간 원심분리를 시행한다. 원심분리기의 내부에는 비말이 날리지 않게 밀봉된 원심분리용 컵을 사용하여야 한다.
- 7) 원심분리가 끝난 상층액은 살균소독제가 채워진 용기에 따라 버린다.
- 8) 멸균된 3 mm 직경의 미생물용 루프로 침사의 일부를 떼어내어 새 유리 슬라이드에 1 × 2 cm 넓이로 도

말한다. 침사의 양이 매우 적은 경우에는 0.2% bovine serum albumin을 첨가한 후에 도말을 만든다.

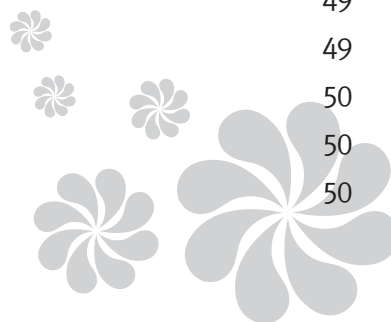
9) 남은 침사를 1-2 mL의 멸균 생리식염수 또는 멸균 증류수에 부유시킨다.

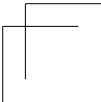
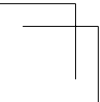
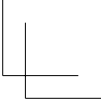
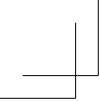
10) 만들어진 부유액을 적절한 배지에 접종한다. 고체배지에 접종하는 경우, 남아 있는 CPC가 항산균의 성장을 억제할 수 있다. Ogawa나 Lowenstein-Jensen (LJ)같은 계란성분배지에 포함된 인지질(phospholipid)은 이런 억제효과를 중화한다. 부유액을 Difco사의 Bacto 중화완충액으로 처리하면 CPC의 억제효과가 나타나지 않는다는 보고가 있다(단, CPC로 전처리한 검체는 액체배지에 접종해서는 안 된다).

III. 항산균 도말검사

결핵검사지침

1. 가이드라인	41
1.1. 검사원리	41
1.2. 항산균 도말검사의 정도관리	42
1.3. 결과 및 해석	43
1.4. 항산균 도말검사의 결과보고	44
1.5. 항산균 도말검사의 한계	44
1.6. 참고문헌	44
2. 검사절차	45
2.1. 검체 채취, 운반 및 보관	45
2.2. 장비, 기구 및 재료	45
2.3. 정도관리	47
2.4. 검사절차	47
2.5. 검사결과	49
2.6. 항산균의 형태	49
2.7. 결과	49
2.8. 검사결과 보고	50
2.9. 검사의 제한점	50
2.10. 참고문헌	50





III. 항산균 도말검사

1. 가이드라인

1. 검사원리

결핵균 등의 항산균은 일반적인 방법으로는 염색이 되지 않지만 fuchsin이나 auramine O 등의 염료에 의해 일단 염색이 되면 강한 산에도 탈색되지 않는다. 이와 같은 항산성을 확인하기 위해서 carbol fuchsin 염색 (Ziehl-Neelsen 또는 Kinyoun 염색) 또는 형광염색(auramine O 염색 및 auramine-rhodamine 염색)이 주로 사용된다. Carbol fuchsin 염색의 경우 현미경 1,000배의 배율로 많은 시야를 관찰해야 하는 반면, 형광염색의 경우에는 현미경 200-250배 혹은 400-450배에서 관찰한다.

일부 신속발육균(rapidly growing mycobacteria)의 경우 그람염색에서 그람양성 간균으로 관찰되기도 하지만, 일반적으로 항산균에 대한 그람염색은 부적절하다. 항산균의 염색에 있어서 일차적으로 폐놀과 열이 항산균의 염색을 수월하게 하는 역할을 하며, 이후 항산균은 fuchsin 등의 arylmethane 염료와 안정적인 화합물을 이룬다. 세포벽의 mycolic acid residues는 acid-alcohol이나 강한 mineral acids에 노출된 이후에도 염색상을 유지하게 한다. 탈색에 대한 이러한 저항성을 일컬어 항산성이라 한다.

한편 항산균은 형광염료(auramine O 또는 auramine O-rhodamine B)에 의해서도 염색된다. Auramine O는 세포벽의 mycolic acid에 결합하는 것으로 알려져 있으며 DNA 및 RNA에 대한 결합에 의해 형광이 더 강해지는 특성이 있다. 형광염색은 Ziehl-Neelsen 염색에 비해 판정시간이 짧고, 슬라이드에 열을 가할 필요가 없으며, 염색과정도 상대적으로 간단하다.

도말의 판정에 있어서 위양성을 배제하기 위해서는 형태학적 특징을 조심스럽게 관찰해야 한다. 항산균은 1-10 μm 길이의 가느다란 간균으로서 0.2-0.6 μm 의 폭을 가지고 있으며 굽어져 보일 수 있다. 각각의 항산균은 강하게 염색된 부분과 그렇지 않은 부분을 동시에 보일 수 있어 염주 모양으로 관찰될 수 있다. 액체배양 시 결핵균이 엉겨붙어 특징적인 꾸불꾸불한 끈(cord)을 형성할 수 있으나, 이는 *M. avium complex* (MAC),

Mycobacterium gordonae, *M. chelonae*, *M. marinum* 등에서도 나타날 수 있으므로 주의를 요한다. 신속발육균의 경우 전체 세포 중에서 일부만 항산성을 보일 수 있으며 형광염료에 의해 염색되지 않을 수 있다. 따라서 신속발육균이 존재할 것으로 예상되나 염색에서 음성인 경우 carbol fushcin 염색 후 탈색과정을 약하게 하여 재확인할 필요가 있다. *Rhodococcus species*, *Nocardia species*, *Legionella micdadei* 등이 항산성을 보일 수 있어 유의하여야 한다. Kinyoun 염색은 Ziehl-Neelsen 염색이나 형광염색보다 그 성능이 떨어진다.

Carbol fuchsin 염색의 경우 음성으로 판정하기 전에 최소한 300 시야(1,000배)를 관찰하여야 하며, 형광염색의 경우 최소한 30 시야(200-250배)를 관찰하여야 한다. 도말이 양성인 경우 또 다른 검사자에 의해 재확인하는 것이 권장되며, 양성 슬라이드는 일정 기간 동안 보관하여야 한다. 형광염색은 저배율에서 관찰하므로 판독이 상대적으로 수월하지만, artifact에 의한 위양성 가능성이 있다. 따라서 형광염색에서 적은 수의 항산균이 관찰될 때는 carbol fuchsin 염색으로 다시 확인하는 것이 권장된다. 통상적인 형광현미경은 200-300시간마다 광원을 교체해야 하기 때문에 지속적으로 운영비용이 발생한다. 최근에 도입된 LED 형광현미경은 광원으로 LED를 사용하여 사용시간이 약 150,000시간으로 거의 반영구적인 장점이 있다.

일반적으로 10^6 AFB/mL 정도 균농도에서 도말 양성 소견을 보이며, 10^4 AFB/mL에서는 도말의 60%만이 양성이다. 도말의 민감도는 보고에 따라 22%에서 80%로 다양하나 특이도는 매우 높다. 민감도에 영향을 미치는 중요인자 중 하나는 제출된 객담의 양이다. 5 mL를 넘는 객담으로부터 집균된 도말의 민감도는 객담의 양에 무관하게 진행된 도말에 비해 의미 있게 높았다. 호흡기 검체가 가장 높은 도말 양성률을 보이며, 체액검체의 도말 양성률은 낮은 편이다. 형광염색이 carbol fuchsin 염색보다 10% 정도 더 높은 민감도를 보이는 것으로 알려져 있다. 한편 오염제거 과정이 과다하거나 배양기간이 짧은 경우에는 도말에서는 양성이지만 배양에서는 음성인 경우가 발생할 수 있다. 또한 폐결핵 환자는 적절한 치료를 받더라도 2-10주 동안 죽은 균을 배출하여 도말검사가 양성일 수 있다. 이 경우 배양결과를 확인해야 한다.

2. 항산균 도말검사의 정도관리

매번 도말검사를 시행할 때 그리고 새로운 batch의 염색시약을 사용할 때 양성과 음성 정도관리 슬라이드를 포함하여 검사를 시행한다. *Escherichia coli*는 음성대조에 흔히 사용되며 양성대조는 결핵균 또는 비결핵항산균으로 제조한다. 양성대조 슬라이드는 원칙적으로 활동성결핵을 가진 환자의 객담으로 만들어야 하지만, 실제로는 많은 검사실에서 보관된 균액을 사용하고 있다. 염색과정 중 슬라이드의 교차오염 및 비결핵항산균에 오염된 물 등이 위양성의 원인이 될 수 있다. 치료에 의한 경우를 배제하고서도 도말양성/배양음성 검체의 비율이 2% 넘는 경우 검체 전처리나 염색에 사용하는 물이나 시약이 비결핵항산균에 의해 오염되었음을 시사하며, 이

경우 *M. gordonae*나 *Mycobacterium terrae* complex와 관련된 경우가 많다. 항산균 염색과정 중 슬라이드 사이에 적절한 거리를 두지 않을 경우 교차오염이 발생할 수 있으며, 양성 슬라이드를 관찰한 뒤 현미경오일에 의해서도 위양성이 발생할 수 있다.

3. 결과 및 해석

도말검사 결과는 반정량적으로 보고하며, 미국 질병관리본부와 세계보건기구의 판정기준은 각각 다음과 같다. 국내 대부분의 검사실은 미국 질병관리본부 기준을 따르고 있으며 보건소, 결핵협회 등의 공공검사실에서는 세계보건기구 기준을 따르고 있다.

표 1. 항산균 도말검사의 보고 기준(미국 질병관리본부)

Report	Fluorochrome		Carbolfuchsin, × 1,000
	× 250	× 450	
No AFB seen	0	0	0
Doubtful; repeat	1–2/30 fields	1–2/70 fields	1–2/300 fields
1+	1–9/10 fields	2–18/50 fields	1–9/100 fields
2+	1–9/field	4–36/10 fields	1–9/10 fields
3+	10–90/field	4–36/field	1–9/field
4+	>90/field	>36/field	>9/field

표 2. 항산균 도말검사의 보고 기준(세계보건기구)

WHO/UNION scale (1,000× field=HPF) Result	Microscopy system used		
	Bright field (1,000× magnification; 1 length=2 cm=100 HPF)	Fluorescence (200– 250× magnification; 1 length=30 fields= 300 HPF)	Fluorescence (400× magnification; 1 length=40 fields= 200 HPF)
Negative	Zero AFB/1 length	Zero AFB/1 length	Zero AFB/1 length
Scanty (actual count)	1–9 AFB/1 length or 100 HPF	1–29 AFB/1 length	1–19 AFB/1 length
1+	10–99 AFB/1 length or 100 HPF	30–299 AFB/1 length	20–199 AFB/1 length
2+	1–10 AFB/1 HPF on average	10–100 AFB/1 field	5–50 AFB/1 field
3+	>10 AFB/1 HPF on average	>100 AFB/1 field	>50 AFB/1 field

HPF: high-power field.

4. 항산균 도말검사의 결과보고

항산균 도말검사의 결과는 검체 접수 후 24시간 안에 얻어져야 하며, 양성인 경우에 검체 접수 후 24시간 이내에 통보되어야 한다.

5. 항산균 도말검사의 한계

항산균 도말검사에서는 결핵균뿐만 아니라 비결핵항산균도 양성소견을 보인다. 적절한 항결핵제치료를 받는 결핵환자에서 배출되는 죽은 결핵균에 의해 도말검사에서 양성이 나올 수 있어 주의를 요한다. 또한 항산균 이외에도 *Rhodococcus* species, *Nocardia* species, *Legionella micdadei* 등이 다양한 항산성을 보일 수 있음에도 유의하여야 한다.

참고문헌

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. CLSI document M48-A. CLSI, Wayne PA, 2008
2. CMPH 3rd Section 7, Mycobacteriology & Antimycobacterial Susceptibility Testing
3. MCM 10th Chapter 28, Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures

2. 검사절차

1. 검체 채취, 운반 및 보관

1) 검체

항산균이 있을 것으로 의심되는 임상검체나 항산균 배양양성에 대해서는 항산성(acid-fastness)을 확인하기 위해 항산균 도말검사를 시행해야 한다. 위흡인액 검체와 소변검체에서 염색을 할 필요가 있는가에 대해서는 논란이 있다. 집균하지 않은 채로 임상검체를 직접 도말하는 것은 권장되지 않는데, 이는 집균도말에 비해 민감도가 떨어지기 때문이다.

일반적으로 결핵이나 항산균 질환의 진단을 위해 항산균 도말검사를 시행해야 하는 검체는 객담이나, 기관지 세척액, 기관지폐포세척액 등의 호흡기 검체 등이다. 이외에도 무균 체액검체나 조직검체에서 항산균 도말검사를 시행할 수 있다. 항산균 도말검사는 오염제거 후 집균된 검체의 침사를 이용한다.

2) 염색을 위한 도말 준비과정

- 검체의 침사를 멸균된 직경 3 mm 미생물검사용 루프로 떠서 도말을 만든다. 또는 멸균된 모세관피펫으로 한 방울을 옮겨 도말을 만든다.
- 도말 슬라이드를 생물안전작업대에서 건조시킨다.
- 남은 침사는 도말검사를 다시 하거나 배양이 오염되었을 때를 대비하여 냉장보관한다. 임상검체에서 직접 만든 도말은 집균된 검체로 만든 도말에 비해 민감도가 떨어지므로 권장되지 않는다.
- 도말은 염색하기 전에 반드시 고정을 해야 한다. 도말을 고정하기 위해서는 슬라이드건조기(electric slide warmer)에서 65-75°C로 2시간 동안 고정하거나, 슬라이드를 버너 불꽃의 푸른 부분에 서너 차례 통과시켜서 고정하는 방법을 사용한다.

2. 장비, 기구 및 재료

1) Kinyoun법

(1) Carbol fuchsin

- Basic fuchsin 4 g을 95% ethanol 20 mL에 녹인다.
- Phenol 결정 8 g을 증류수 100 mL에 녹인다.
- 두 용액을 섞은 후 갈색병에 보관한다.

- 결정이 생길 경우 여과하거나 새로 제조한다.

(2) 3% acid-alcohol

- 농축된 염산 3 mL를 95% ethanol 97 mL에 첨가한다.

(3) Methylene blue

- Methylene blue chloride 0.3 g을 증류수 100 mL에 녹인다.

2) Ziehl-Neelsen법

(1) Carbol fuchsin

- Basic fuchsin 분말 0.3 g을 95% ethanol 10 mL에 녹인다.
- Phenol 결정 5 g을 증류수 95 mL에 넣고 섞는다.
- Fuchsin 용액과 phenol 용액 90 mL를 잘 섞는다.
- 제조된 용액은 어두운 곳이나 갈색병에 보관한다.

(2) 3% acid-alcohol

- 염산 3 mL를 95% ethanol 97 mL에 첨가한다.

(3) Methylene blue

- Methylene blue chloride 0.3 g을 증류수 100 mL에 녹인다(세계보건기구에서는 대조염색으로 0.1% methylene blue용액을 권장함).

3) 형광염색법(Fluorochrome acid-fast stain)

(1) Auramine O

- Auramine O 분말 0.1 g을 95% ethanol 10 mL에 녹인다.
- Phenol 결정 3 g을 증류수 87 mL에 녹인다.
- 두 용액을 혼합하여 잘 섞는다.
- 제조된 용액은 갈색병에 넣어 어두운 곳에 보관한다.

(2) 0.5% acid-alcohol

- 농축 염산 0.5 mL를 70% ethanol 1,000 mL에 첨가한다.

(3) Potassium permanganate

- Potassium permanganate 0.6 g을 증류수 100 mL에 녹인다.

3. 정도관리

1) 정도관리물질

항산균 도말검사를 시행할 때나, 재료나 시약 또는 배지의 로트(lot)가 바뀔 때에 반드시 양성 및 음성정도관리 슬라이드를 함께 검사한다. 음성정도관리 슬라이드를 만들 때는 대장균(*E. coli*)이 흔히 쓰이며, 양성정도관리 슬라이드를 만들 때는 *M. fortuitum*이나 H37Ra ATCC 25177이 사용된다.

임상검체의 도말 슬라이드를 판독하기 전에 정도관리 슬라이드의 결과를 기록한다. 만약 정도관리 슬라이드의 결과가 부적절하면 검사과정이나 시약준비과정을 재검토한다.

2) Carbol fuchsin 염색

- 양성: 항산균은 적색이나 자홍색으로 염색되며, 배경은 대조염색에 의해 파란색으로 나타난다.
- 음성: 대장균은 대조염색에 의해 파란색으로 염색되어 보인다.

3) 형광염색(auramine O 혹은 auramine-rhodamine)

- 양성: 항산균 균종은 염료에 따라 초록색, 노란색, 오렌지색 등으로 염색된다(형광의 색상은 사용하는 필터에 따라 달라질 수 있다).
- 음성: 대장균은 형광을 보이지 않는다.

4. 검사절차

검사를 마친 후 슬라이드는 손상성 의료용 폐기물 전용용기에 버리며 슬라이드를 취급할 때는 장갑을 끼야 한다. 위음성을 방지하기 위해서 여러 현미경시야를 관찰해야 한다. 음성으로 보고하기 위해서는 형광염색법의 경우 최소 200-250배에서 30 시야 이상 관찰하여야 한다.

1) Kinyoun법(cold staining)

- 슬라이드 전체에 Kinyoun's carbol fuchsin 용액을 충분히 붓고 최소 5분 동안 염색한다.
- 슬라이드를 물로 씻는다.
- 탈색을 위해 슬라이드에 3% acid-alcohol을 3분간 부은 후 슬라이드에서 색이 빠져 나오지 않는 것을 확인한다.
- 슬라이드를 물로 씻고, 물기가 너무 남지 않게 흘려낸다.
- 대조염색시약(methylene blue)을 슬라이드에 충분히 붓고 1분 동안 염색한다.
- 슬라이드를 물로 깨끗이 씻고, 물기가 너무 남지 않게 흘려낸다.
- 공기 중에서 건조시키며 흡습지를 이용해 물기를 제거하지 않는다.
- 100× 대물렌즈가 달린 광학현미경으로 관찰한다(1,000배).

2) Ziehl-Neelsen법(hot staining)

- 열고정한 슬라이드에 carbol fuchsin을 충분히 붓는다. 여과지로 슬라이드를 덮은 후에 염색하면 가온과정에서 결정생성이 줄어들고, 슬라이드에 염색이 잘 정착되는 효과를 볼 수 있다.
- 슬라이드에서 김이 올라올 때까지 전기염색장치나 분젠 버너로 가열한다. 염색시약이 마르지 않도록 주의한다.
- 슬라이드를 최소 5분간 염색한다. 도말이 마르면 염색시약을 추가하고 다시 가열하지는 않는다.
- 여과지를 사용한 경우 집게로 여과지를 제거하고 고압증기멸균하여 폐기한다.
- 슬라이드를 물로 씻는다.
- 슬라이드에 3% acid-alcohol을 붓고 3분간 탈색시킨다.
- 슬라이드를 물로 씻고, 물기가 너무 남지 않게 흘려낸다.
- 대조염색시약(methylene blue)을 붓고 1분간 염색한다.
- 슬라이드를 물로 씻고, 물기가 너무 남지 않게 흘려낸 후 공기 중에서 건조시킨다.
- 100× 대물렌즈가 달린 광학현미경으로 관찰한다(1,000배).

3) 형광염색법(fluorescent staining)

- 슬라이드에 형광염색 시약을 붓고 20분간 염색한다.
- 슬라이드를 물로 씻은 후 너무 많은 물이 남지 않게 흘려낸다.
- 0.5% acid-alcohol을 슬라이드에 얹어 2분간 탈색시킨다.
- 슬라이드를 물로 씻은 후 너무 많은 물이 남지 않게 흘려낸다.

- 대조염색시약을 슬라이드에 붓고 정확히 1분간 염색한다. Potassium permanganate를 대조염색으로 쓰는 경우 시간이 길어지면 항산균의 형광이 약화될 수 있다.
- 슬라이드를 물로 씻은 후 세워두어 물기를 제거한다.
- 공기 중에서 건조시키며 흡습지를 이용해 물기를 제거하지 않는다.
- 도말을 20× 대물렌즈를 이용하여 최소 1 length (30 시야)를 관찰한다. 이는 100× 유침렌즈로 300 시야를 검정한 것에 해당한다.
- 항산균으로 의심되는 형태가 있으면 40× 대물렌즈로 확인한다.
- 필요에 따라 carbol fuchsin으로 재염색한다.

5. 검사결과

1) Carbol fuchsin (Kinyoun, Ziehl-Neelsen) 염색

- 양성결과: 파란 배경에 붉게 염색된 1-10 μ m 길이의 간균이 관찰된다.
- 음성결과: 붉게 염색되는 간균이 관찰되지 않는다.

2) 형광염색법

- 양성결과: 사용하는 형광현미경 필터에 따라 초록색 또는 오렌지색의 1-10 μ m 길이의 가느다란 간균으로 보이며, 배경은 검은 색으로 나타난다. 인공물(artifact)도 형광을 낼 수 있으므로 형태를 면밀히 관찰해야 한다.
- 음성결과: 형광이 관찰되지 않는다.

6. 항산균의 형태

전형적인 항산균은 1-10 μ m 정도 길이의 가느다란 간균으로 살짝 휘거나 굽어 있는 모양이다. 균종에 따라 실모양으로 보이기도 하며 분지된 형태가 관찰될 수 있다. 액체배지에서 배양된 *M. tuberculosis* complex는 전형적인 구불구불한 밧줄 모양(serpentine cord)를 형성하므로 다른 항산균과의 감별에 도움이 된다.

7. 결과

가이드라인의 결과 해석 부분(43 페이지)을 참고하도록 한다.

8. 검사결과 보고

- 항산균 도말검사의 양성결과는 접수 후 24시간 이내에 보고한다.
- 음성: 검사에서 항산균이 발견되지 않은 경우 “항산균 도말 음성(negative for acid-fast bacilli)”이라고 보고한다.
- 양성: “항산균 도말 양성(positive for acid-fast bacilli)”이라고 보고하고 그 결과를 위의 표와 같이 기록한다.

9. 검사의 제한점

- 항산균 도말검사는 항산균에 특이적인 검사가 아니다. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*나 *Cryptosporidium*의 포자낭, *Isospora* 그리고 미포자충(microsporidia) 등이 다양한 정도의 항산성을 보인다.
- 항산균 도말검사는 결핵균과 비결핵항산균을 감별하지 못한다.
- 배양검사와 비교할 경우 항산균 도말검사의 민감도는 22-80%로 알려져 있어 다소 부족하다. 도말검사의 추정검출한계가 객담 1 mL당 항산균 5,000-10,000마리이므로 항산균 도말검사가 음성이라고 하더라도 항산균 존재를 배제할 수 없다. 배양은 1 mL당 10-100마리의 생균도 검출할 수 있다. 결핵균과 같이 천천히 자라는 항산균은 일관되게 항산성을 보이지만, 신속발육균은 항산성이 일정하지 않으며 항산성을 나타내지 않는 경우도 있다. 특히 형광염색을 하였을 경우 이런 현상이 흔하다.
- 항산균 도말검사는 생존성이 없는 균도 검출할 수 있으므로 치료 중인 결핵환자에서 정상적으로 죽은 균이 배출될 수 있어 도말이 양성일 수 있다. 따라서 도말검사는 치료반응을 평가하기에는 부적합하며 반드시 배양결과를 확인해야 한다.

참고문헌

1. LS Garcia and H Isenberg eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd ed. ASM Press, Washington, D. C., 2010.
2. J Versalovic, KC Carroll, G Funke, JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. eds. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington, D.C., 2011.

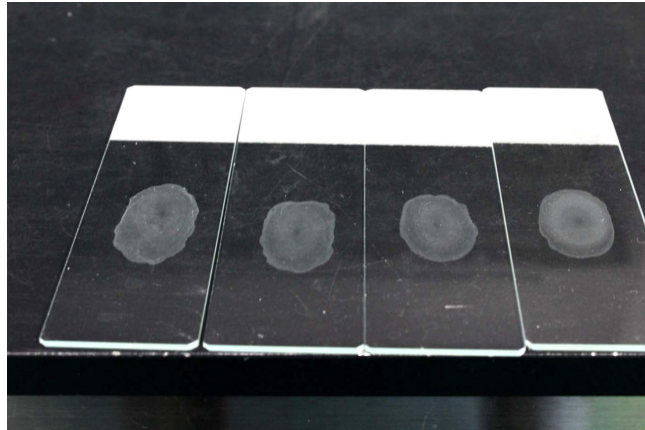


그림 1. 적절한 두께와 크기의 객담도말.

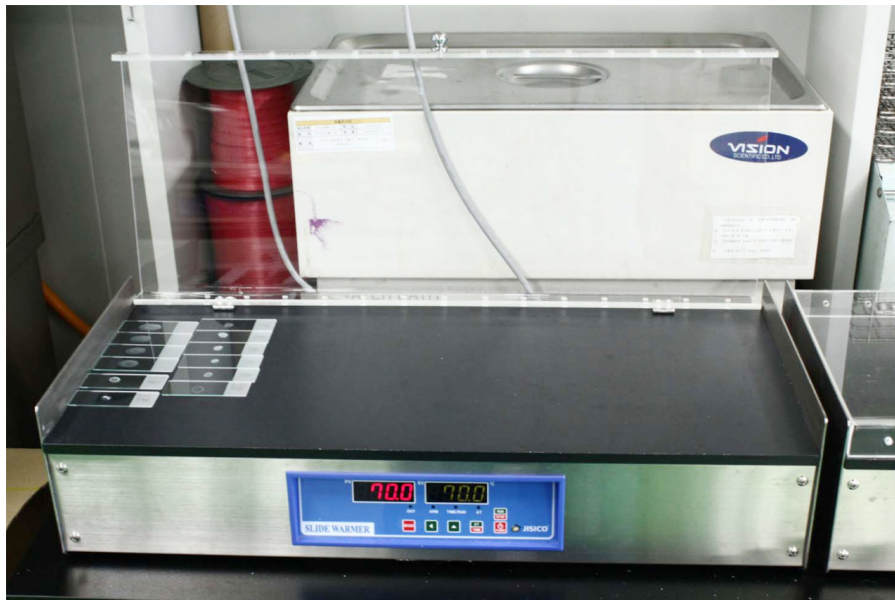


그림 2. 슬라이드 건조기(slide warmer).

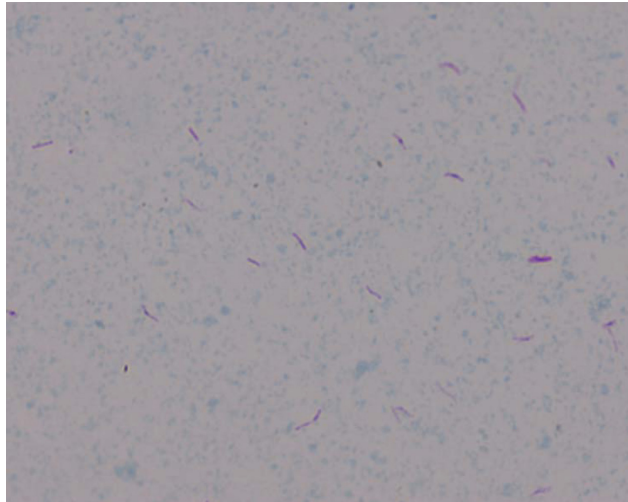


그림 3. Ziehl-Neelsen 염색(1,000배).

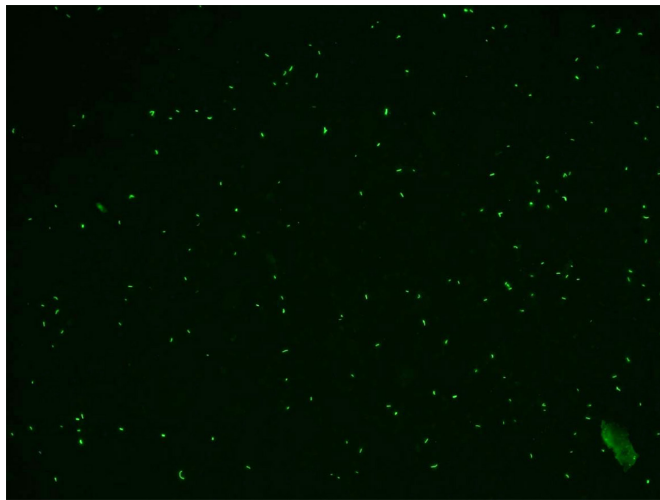


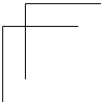
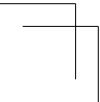
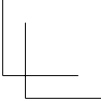
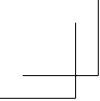
그림 4. Auramine O 염색(200배)

IV. 항산균 배양검사

결핵검사지침

1. 가이드라인	55
1.1. 배양용 검체의 전처리	55
1.2. 배지의 종류와 선택	55
1.3. 배양과정	57
1.4. 결과보고	59
1.5. 항산균 배양검사의 정도관리	60
2. 검사절차	62
2.1. 검사 원리	62
2.2. 장비, 기구 및 재료	62
2.3. 고체배지 배양검사	63
2.4. 액체배지 배양검사	65
2.5. 검사 시 유의할 점	68
2.6. 참고문헌	68





IV. 항산균 배양검사

1. 가이드라인

1. 배양용 검체의 전처리

호흡기 검체, 피부, 연조직(soft tissue), 위세척액, 소변 등 정상 상재균에 의한 오염의 가능성이 있는 검체들은 균질화-오염제거(Homogenization-decontamination) 과정을 거쳐서 항산균 배양을 해야 한다. 모든 오염제거제는 미생물에 독성이 있으므로, 오염률을 0%로 낮추는 것을 목표로 하지 않는다. 통상적으로 Löweinstein-Jensen (LJ) 배지에서 호흡기 검체의 오염률은 2-5%를 유지해야 한다(CLSI M48-A, p.28). 그러나 정상적으로 무균인 검체들(주사기로 흡인한 체액, 뇌척수액, 혈액, 골수, 생검 조직)은 오염제거과정을 시행할 필요가 없다. 조직 검체는 멸균 생리식염수나 0.2% bovine serum albumin (BSA)에 넣어 파쇄한 후 배지에 접종한다.

오염제거 효율을 확인하기 위해서는 4-6개의 객담 검체를 오염 제거과정을 시행한 후 원심 침전하여 혈액한 천배지와 항산균 배양용 배지에 접종하는데, 37°C에서 24-48시간 배양 후 오염세균이 거의 자라지 않아야 한다. 또한, 정기적으로 검사실내 결핵균 배양의 오염률을 감시 하여 고체배지의 오염률이 2-5% 이내인지 확인한다. 모든 실험재료는 적어도 1년에 1번 이상 점검 받아야 한다. 배양에 사용되는 물은 환경에 있는 항산균의 오염을 막기 위해 멸균 증류수를 사용하여야 한다.

2. 배지의 종류와 선택

항산균 배양의 검출률을 높이기 위해서는 적어도 두 가지 종류의 배지를 사용해야 하며, 보다 빠르고 예민한 검사를 위해서는 액체배지를 사용하는 것이 필요하다. 고체배지는 집락의 관찰이 가능하고, 액체배지가 오염되었을 경우를 대비할 수 있다. 또한 혼합 감염을 검출하는 데에도 도움이 되며 항산균의 동정이나 감수성 검사를 시행할 경우 시간을 단축시킬 수 있다. 액체배지를 이용한 배양에 고체배지(LJ 배지)을 추가로 사용할 경우 검출

률이 4-6% 증가되는 반면, LJ 배지에 액체배지를 추가로 사용하면 검출률이 15-30%나 증가된다.

계란성분배지가 아닌 Middlebrook 7H10나 7H11 한천배지를 사용할 경우에는 오염제거제를 위해 Z-TST법과 CPC-NaCl법을 사용해선 안 된다. 액체배지는 균 수가 적은 비호흡기 검체, 치료 중인 환자의 검체에서의 항산균 검출에 유용성이 크다.

Mycobacterium haemophilum, *Mycobacterium genavense*와 같은 균종은 추가의 철분이 요구되므로, hemin, ferric ammonium citrate, 또는 상품화된 X-factor strip을 보충해야 한다. 혈액 검체로부터 항산균을 배양하기 위해서는 일반배지가 아닌 특수배지를 사용하여야 한다.

1) 고체배지

(1) 계란성분배지(Egg-based media)

LJ 배지와 Ogawa배지는 국내에서 항산균 배양에 흔히 사용되는 고체배지이며 말라카이트 그린에 들어있어서 오염된 세균과 진균의 증식을 억제한다. Ogawa배지는 asparagine 대신 더욱 경제적인 sodium glutamate가 첨가되어 있으며 산성이므로 NaOH로 오염 제거 후 중화과정 없이 접종할 수 있다. 반면, NALC-NaOH로 오염을 제거 후 중화과정을 시행하는 검사실에서는 LJ 배지를 쓰는 것이 검출률 향상에 도움이 된다. 계란성분배지에서는 비결핵항산균의 검출률이 낮으며 액체배지에서보다 느리게 자란다. 따라서 *M. avium* complex (MAC)의 검출에는 적당하지 않다. 결핵균 분리를 위해서 8주까지 배양해야 한다.

(2) 한천배지(Agar-based media)

항산균 배양용 한천배지에는 Middlebrook 7H10과 7H11이 있다. 7H11 한천배지는 7H10에 비해 casein hydrolysate가 추가되어 isoniazid 내성 결핵균의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 한천배지는 냉장에서 4-6주간 보관가능하다. Middlebrook agar medium base는 한번 증기멸균소독을 한 후 재가열하면 안 된다. 제조된 배지는 직접 태양광선에 노출되어서는 안 되는데 결핵균에 유해한 formaldehyde가 생성되기 때문이다. 한천배지는 계란성분배지에 비해 집락 관찰과 계수가 용이한 장점이 있다. 표면도 더 넓고, 항산균의 발육이 더 잘 되어서 감수성 검사시 내성 비율을 정하기가 용이하다. 결핵균의 경우 6주까지 관찰해야 하고, 일부 느리게 자라는 비결핵항산균(예, *M. haemophilum*)에 대해서는 8주까지 관찰해야 한다.

2) 액체배지

항산균은 첨가물을 넣지 않은 고체배지에서보다 액체배지에서 더 잘 자라므로, 느리게 증식하는 항산균도 평균 12-16일만에 증식한다. 따라서 액체배지를 이용하는 경우 평균 4주 이내에 결핵균의 검출과 감수성 검사결

과까지 보고할 수 있다. 이처럼 액체배지를 이용하면 고체배지를 사용한 경우보다 양성률이 유의하게 증가하고, 보고시간이 단축되므로 항산균의 검출과 감수성 검사에 액체배지의 사용을 권장한다. 항산균 배양용 액체배지는 실온에 보관한다.

액체배지를 이용하여 항산균 배양을 하는 경우 다양한 일반 세균 및 진균의 성장을 억제하기 위해 항균제를 첨가한다. BACTEC MGIT 960 (BD)의 경우는 polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim 및 azlocillin을 첨가하고, BactAlert (bioMerieux)의 경우에는 위의 다섯 가지 항균제 외에 vancomycin을 추가로 첨가한다. 그러나 항균제가 첨가됨에도 불구하고 액체배지를 사용하는 경우 고체배지보다 오염 가능성이 높으므로, 오염제거제의 농도, 오염제거 시간 등을 지속적으로 감시 해야 한다.

3. 배양과정

1) 검체접종

모든 검체의 처리와 접종은 생물안전작업대 안에서 시행해야 한다. 100-200 μ L의 검체를 접종해서 LJ배지 사면에 전체적으로 퍼지게 한다. 처음 1-2일은 마개를 느슨하게 하고 사면이 수평을 이루게 하여 접종된 검체가 골고루 퍼지도록 한다. 검체가 완전히 흡수된 것을 확인한 후 마개를 막고 배양병을 세워서 배양한다. 평판배지의 경우 세 방울을 배지 표면에 따로 떨어뜨린다. 평판배지는 액체가 완전히 흡수될 때까지 실온에 둔 후 비닐백(polyethylene bag)에 넣어 배양기에 넣는다. 액체배지의 경우, 제조사의 지침을 철저히 따라야 한다.

2) 배양 조건

결핵균의 최적 배양 온도는 35-37°C이다. 몇몇의 비결핵항산균(*M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *Mycobacterium ulcerans*)은 25-33°C에서 잘 자란다. 검체에 이런 균종이 있을 것으로 의심될 경우 (피부, 뼈, 관절 생검)에는 두 개의 배지에 접종하여 한 개는 37°C에, 다른 한 개는 낮은 온도에서 배양해야 하는 것이 좋다. 반면 *Mycobacterium xenopi*는 40-42°C 정도의 높은 온도에서 잘 자란다.

고체배지, 특히 계란성분배지의 경우 배양 음성으로 보고하기까지 8주의 배양기간이 필요하다. 대부분의 액체배지는 음성보고를 위해 6주까지 배양한다. *M. ulcerans*와 *M. genavense*의 경우 8-12주가 필요하다.

Middlebrook 배지를 쓸 경우 5-10% CO₂ 대기 조건에서 배양해야 한다. 계란성분배지의 경우 CO₂가 도움이 되나 결정적인 요소는 아니다. 액체배지의 경우 별도의 CO₂가 필요하지 않다.

3) 배양 관찰

배양 후 1주부터 매주 관찰한다. 1주째의 관찰은 신속발육균의 관찰을 위해 필요하며, 오염된 검체의 경우 오염균으로 뒤덮이기 전에 항산균을 관찰할 수 있다. 고체배지의 경우 반정량적 보고를 하기 위해서는 배양될 수 있는 대부분의 항산균이 자랄 수 있도록 4주간 배양을 한 후에 보고하여야 한다. 미국 질병관리본부에서는 50 집락 미만일 경우에는 실제 수를, 50-100집락일 경우 1+, 100-200일 경우 2+, 200-500집락일 경우 3+, 500 이상일 경우 4+로 보고할 것을 권장한다.

액체배지의 경우 자동화된 장비가 배양양성을 검출할 수 있으며, 일부 장비에서는 성장 속도에 따라서 오염균을 의심할 수도 있다. 모든 배양양성 검체는 항산성 염색으로 확인해야 하며, 오염 여부는 혈액한천배지 또는 초콜렛 배지에 계대배양해서 확인할 수 있으며, 그람염색도 도움이 된다. 만일 장비에서 배양양성으로 판정되었으나, 항산성 염색에서 음성인 경우 2-3일간 다시 배양 후 항산균의 존재 여부를 확인해야 한다. 장비에 의해 음성으로 판정된 모든 배지는 버리기 전에 육안으로 관찰해야 하고, 이 중 배양 양성이 의심되는 경우 위에 기술한 것과 동일한 과정을 거쳐야 한다. 액체배지의 경우 정량 보고는 할 수 없으나, 배양 양성으로 판정되기까지 소요되는 시간이 검체 내의 균 수와 직접 관련이 있다.

4) 오염 관리

배지의 오염은 검체, 오염된 시약 또는 환경에서 기인한다. 관례적으로, LJ 배지 사용시 호흡기 검체의 오염률이 2-5%면 적합하다. 액체배지의 경우 좀더 오염되기 쉬우므로, 이보다 조금 높은 오염률도 적합하다고 볼 수 있다.

검체 처리 또는 배양과정 중의 오염을 배제하기 위해서 매 검사마다 음성 대조로 멸균 증류수 또는 완충액(10 mL)을 검체와 동일하게 처리하여 배양 전 과정을 거친 후 음성임을 확인해야 한다. 음성대조가 양성으로 될 경우 몇 가지 조치를 취해야 한다.

항산균과 함께 일반세균도 같이 자란 경우 액체배지를 다시 검체 전처리와 유사하게 처리하여 다시 배양한다. 점액성의 *Pseudomonas*가 오염된 경우 oxalic acid로 처리할 수 있다. 두 가지 이상의 항산균이 자란 경우 일부를 Middlebrook 배지에 계대배양하여 1-3주간 배양 후 집락을 분리한다.

오염제거제의 batch가 바뀌면, 새로운 오염 제거제를 이용하여 4-6개의 객담 검체를 전처리한 후 혈액한천 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 오염균이 거의 없음을 확인해야 한다.

5) 배양 양성 검체의 보관

배양 양성 검체는 실온에서 수 주간 생존력의 큰 손실 없이 보관할 수 있다. 고체배지 배양의 경우, 시험관을

싸서 마르지 않게 해야 한다. 냉장 시 더 오래 보관할 수 있다. 1년 이상 장기보관할 경우 집락을 물, 생리식염수 또는 7H9 액체배지에 풀어서 균질화 한 후 McFarland No. 1 탁도에 맞추어 $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다. 액체배지의 경우 그대로 분주하여 $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다.

4. 결과보고

1) 중간보고

균증식이 관찰되면 도말검사를 시행하여 항산균 여부를 확인하고 즉시 보고해야 하며 균종 동정 결과를 보고할 예정이라는 것을 알려야 한다. 따라서 “항산균 배양 양성, 균종 동정 중”으로 보고한다. 집락 모양과 cord 형성은 결핵균의 특징 중의 하나이긴 하지만 다른 항산균에서도 보일 수 있으므로 형태적 특징만으로 동정하면 안 된다. 한 개 배지에서만 자라더라도 보고한다. 보고서에 배지의 종류와 배양 양성까지의 배양기간을 포함할 수 있다.

2) 배양 확인 보고

항산균 증식이 확인되면 반드시 결핵균 감별검사를 실시한 후 결핵균과 비결핵항산균을 구별하여 보고한다. 해당 검사실에서 비결핵항산균에 대한 균종동정을 시행하는 경우 균종명까지 보고한다. 결핵균이 배양될 경우 결과를 임상에 직접 통보하고 통보 받은 사람의 이름을 기록한다.

항산균 배양양성 시 결핵균 감별은 MPT64 (혹은 MPB64) 항원 검사와 PCR을 주로 이용한다. MPT64 항원 검사의 경우 균농도가 낮거나 MPT64 유전자에 변이가 있을 시 위음성이 발생할 수 있다. 따라서 배양에서 항산균이 확인되었으나 항원검사 음성일 경우 PCR로 확인하는 것이 좋다.

비결핵항산균의 균종 동정은 PCR hybridization, sequencing, PCR-restriction enzyme analysis 등의 방법을 이용한다. 미국흉부학회(American Thoracic Society)에서는 다음과 같은 미생물검사 결과가 나올 경우 비결핵항산균 폐질환을 의심할 수 있다고 권고하였다.

- 최소 2회 이상 객담 배양에서 비결핵항산균 양성
- 최소한 1회 이상 기관지 세척액(wash or lavage) 배양에서 비결핵항산균 양성
- 폐조직 생검 등 조직검사서 항산균 감염의 병리학적 증거(육아종성 염증 혹은 항산균 존재)가 있으면서 배양에서 비결핵항산균 양성이거나 혹은 폐조직 생검 등 조직검사서 항산균 감염의 병리학적 증거가 있으면서 1회 이상 객담 또는 기관지 세척액 배양에서 비결핵항산균 양성

5. 항산균 배양검사의 정도관리

정도 관리의 주기는 검사실의 업무량, 배지의 종류, 검사실의 정책에 따른다. 모든 정도 관리의 술기와 시행 결과는 기록되어야 한다. 시행 결과가 불만족스러울 때에는 수정 조치를 행하고 기록해야 한다. 모든 배지의 batch 번호와 유효기간은 기록되어야 한다. 상품화된 배지의 정도 관리 기록은 제조사로부터 받아 보관하여야 한다.

1) 배지의 정도 관리

새롭게 제조된 batch마다 1-3%를 선택하여 정도관리를 실시한다. 최소한 3종류 이상의 항산균을 이용하여 각 균종별로 표준화된 탁도의 균액을 접종하여 일정 기간 내에 자라는 집락의 수와 크기를 엄격히 평가해야 한다. 상품화된 배지나 이전에 좋은 결과를 보인 배지를 양성 대조로 비교한다. 예상되는 집락 수의 $\pm 20\%$ 이내에 들면 적합한 것으로 판정하거나 각 검사실 자체 허용범위를 설정해도 된다. 신속발육균과 결핵균을 각각 접종하여 신속발육균 배양 결과가 적합하면 해당 lot의 배지를 사용하고 결핵균의 결과는 추후 확인한다.

상품화된 배지의 경우 제조사에서 정도관리를 시행하였기 때문에 검사실에서 직접 정도관리를 시행할 필요는 없다. 그러나 사용 전에 운송이나 보관 중 파손이나 오염이 발생하였는지를 확인하는 것이 매우 중요하다.

2) 검체 전처리와 항산균 분리의 일관성 평가를 통한 정도관리

검사실 정보를 잘 기록하고 주기적으로 자료를 검토하는 것은 검사과정이 잘 관리되고 있다는 것을 확인하는데 도움이 된다. 초기에 3-6개월의 기록을 분석하여 검사량의 평균이나 변화추이를 판단할 수 있다. 추후 분석은 1-3개월 주기로 실시하며 아래에 기술된 지표들을 감시해야 한다. 이들 지표들은 큰 변동 없이 일정하게 유지되어야 하며 의미있는 변화나 편차가 발생하면 모든 검사과정을 점검해야 한다.

[검사 일관성 평가에 사용되는 지표들]

- 전체 검체 수
- 도말 양성과 음성 건수와 비율(%)
- 결핵균과 비결핵항산균의 양성 건수와 비율
- 결핵균과 비결핵항산균 검출에 소요된 평균 검출시간
- 배양 오염률
- 검사를 시행한 검사자
- 한 개의 batch로 시행된 모든 검체의 결과

- 음성 대조 결과
- 배양 온도

항산균 도말 양성율은 환자의 분포 또는 검사방법에 따라 검사실마다 다르다. 그러나, 도말 양성율이 정상 범위 이하로 내려가면, 적어도 도말 음성 검체의 20%를 재검해야 한다.

항산균 도말 양성 또는 음성 검체의 배양 양성률이 현저히 감소하면, 과도한 오염제거로 인한 항산균의 사멸의 가능성이 있으므로 오염제거 과정을 검토해 봐야 한다. 결핵 양성률의 변화가 비결핵항산균의 변화보다 더 중요하다. 잘 관리되는 검사실의 경우 도말검사 양성 검체의 90% 이상이 배양 양성이다. 일반적으로 전체 배양 양성 검체 중 약 50%가 염색 음성 검체에서 분리된 것이다.

결핵균과 비결핵항산균의 평균 비율은 일정하게 유지되어야 한다. 만일 특정 균종이 증가하면 오염이나 교차 오염(cross-contamination)의 가능성이 높으므로 철저히 조사해야 한다.

도말 양성 및 음성 검체에서 결핵균과 비결핵항산균의 평균 검출시간은 검사실 배양 업무의 일관성을 나타내는 좋은 지표이다. 이 평균값은 3-6개월 기간으로 계산할 수 있다. 오염률의 증가나 신속발육 비결핵항산균의 증가 없이 평균 시간이 짧아지면 이는 검사 과정이 개선되었음을 의미한다. 만일, 평균 시간이 길어지면 이는 오염제거가 너무 강하거나 원심침전 시간이나 속도가 적절하지 않음을 의미한다.



2. 검사절차

1. 검사 원리

항산균의 배양률을 높이기 위해 임상검체에 대해 오염제거, 집균 등 전처리 과정을 시행해야 한다. 검체 전처리는 앞에서 기술된 내용을 참고한다. 최적의 양성율을 위해서 고체 및 액체배지 모두를 사용하는 것을 권장한다. 고체배지에는 Ogawa나 LJ와 같은 계란성분배지와 Middlebrook 7H10, 7H11과 같은 한천배지가 있다. 액체배지에는 Middlebrook 7H9이나 Dubos 배지가 있다. 국내에서는 전통적으로 Ogawa 배지가 많이 이용되었으나 최근 상품화된 액체배지 자동배양 시스템의 사용빈도가 높아지고 있다. BD사의 MGIT 960 system은 Middlebrook 7H9을 변형시킨 액체배지(MGIT 튜브)와 성장촉진용 첨가물(MGIT Growth supplement), 항균제(MGIT PANTA)를 혼합하여 사용하고, 미생물의 산소사용에 따라 발생하는 형광신호를 검출한다. bioMerieux사의 BacT/ALERT 3D system도 MGIT과 유사하며 미생물이 증식하면서 생성하는 CO₂를 검출한다.

2. 장비, 기구 및 재료

- 원심분리기(에어로졸이 새어 나오지 않도록 밀폐 설계된 원심분리기 사용)
- 생물안전작업대(Class II type)
- 배양기(incubator)
- 고체배지: 2% Ogawa 혹은 LJ 배지
- BACTEC MGIT 960 system
 - MGIT tube, MGIT Growth supplement, MGIT PANTA
- BacT/ALERT 3D system
 - BacT/ALERT MP bottle, MB/BacT Antibiotic Supplement (MAS)
- 개인보호장비: 라텍스 장갑, N-95 마스크, 가운, 보호안경
- 소독제
- 마이크로 피펫, 멸균 파스퇴르 피펫

3. 고체배지 배양검사

1) 정도관리

- 적절한 정도관리를 거친 상품화된 배지를 사용할 경우 자체 정도관리를 시행하지 않아도 된다.
- 제조사로부터 정도관리 결과지를 받아 보관한다.
- 검사실에서 직접 배지를 제조하는 경우 양성과 음성대조를 이용하여 정도관리를 시행한다.
- 보존기간이 지난 배지를 사용하지 않는다.
- 각 batch별로 1-3%를 배양하여 배지의 무균성을 시험하고 양성대조와 음성대조 균주를 이용하여 정도관리를 시행한다.
- 양성대조 균주
 - *M. tuberculosis* ATCC 25177
 - *M. kansasii* ATCC 12478
 - *M. scrofulaceum* ATCC 19981
 - *M. intracellulare* ATCC 13950
 - *M. fortuitum* ATCC 6841
- 음성대조 균주
 - *E. coli* ATCC 25922

2) 정도관리 방법

- 고체배지에 자란 집락을 7H9 액체배지에 풀어서 균액을 만들고 탁도를 McFarland 0.5에 맞춘다.
- 보정된 루프나 피펫으로 균액 10 μ L를 배지에 접종 후 35-37°C에 4주간 배양한다.
- 정도관리 결과 판정
 - 양성대조 균주: 모든 시험배지에서 증식
 - 음성대조 균주: 부분 또는 완전 성장 억제
- 정도관리 결과 이상 시 적합한 결과가 나올 때까지 결과보고를 보류한다. 새로운 배지, 시약, 새 균주로 검사를 반복한다. 정도관리가 적합할 경우 검사결과를 보고한다.
- 배양검사 과정에서 검체 대신 동량의 멸균 증류수를 음성대조로 사용하여 정도관리를 시행한다. 음성대조에서 균 증식이 검출되지 않는 경우 '적합'으로 평가한다.

3) 검사절차

(1) Ogawa 배지

- 접종 전 Ogawa 배지의 응결수를 제거한다. 배지사면이 아래로 향하게 하여 멸균 거즈에 접촉시켜 사면을 따라 흘러 버린다.
- 검체 침사 100-200 μ L를 파스퇴르 피펫을 이용하여 배지사면에 고루 퍼지도록 접종한다. 검체가 배지사면에 충분히 흡수되도록 배지 뚜껑을 약간 열어둔 채로 기울여서 1-2일 배양한다.
- 나사마개가 아닌 고무마개가 있는 배지의 경우 접종 후 고무마개를 2-3회 눌러 절개선을 확인하고 완전히 밀폐된 상태가 되도록 한다. 고무마개에 중앙절개부위가 있어서 통기가 되므로 따로 환기를 위한 조작이 필요치 않다.
- 접종된 배지는 35-37°C 배양기에서 빛을 차단하여 배양한다.
- 접종 3일에 배지를 관찰하여 검체가 잘 흡수되었는지를 확인한다. 또한 세균 오염 여부도 함께 확인한다. 검체가 잘 흡수되었을 경우 마개를 잘 닫고 배양병은 세워서 배양할 수 있다.
- 이후 주 1회 판독한다.
- 음성판정을 위해서는 8주까지 배양한다.

(2) 한천배지(Middlebrook 7H10, 7H11)

- 파스퇴르 피펫을 이용하여 침사 3방울을 평판배지에 분주하고 배지 표면에 멸균 루프로 고르게 접종한다.
- 접종 후 배지를 CO₂ 투과 백에 넣고 검체가 흡수 될 때까지 24시간 기다린 후 뒤집는다.
- 접종된 배지는 35-37°C 배양기에서 빛을 차단하고 배양한다.
- 접종 3-5일부터 관찰을 하며 배양 4주까지는 주 2회 판독한다. 그 이후는 주 1회 판독하며 음성판정을 위해서 8주까지 배양한다. 양성인 경우 결과를 보고한다.

4) 검사결과 판정

균증식이 관찰될 경우 집락의 색, 모양 등의 특성과 집락 수를 기록한다. 배양균주로 도말검사를 실시하여 항산균여부를 확인한다. 항산균으로 확인된 경우 "항산균 배양양성, 균종 동정 중"으로 보고한다. 균종동정에서 결핵균이 확인되면 주치의에게 즉시 연락한다.

4. 액체배지 배양검사

1) 정도관리

새로운 lot의 배지가 들어올 때마다 *M. tuberculosis* ATCC 27294 등의 표준균주를 이용하여 배양 정도관리를 시행한다. 균종별 희석 방법과 배양 양성 시간은 표 1에 나와있다.

표 1. 액체배양 시스템 정도관리에 사용되는 표준균주와 허용 검출시간

균종	MGIT		BacT/ALERT	
	균액 농도	검출시간(일)	균액 농도	검출시간(일)
<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	0.5 McFarland 1:500 희석	6-10	10 ⁴ CFU/mL	11-13
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	0.5 McFarland 1:50,000 희석	6-11	10 ⁴ CFU/mL	11-13
<i>M. fortuitum</i> (ATCC 6841)	0.5 McFarland 1:5,000 희석	1-3	10 ⁴ CFU/mL	2-5

2) 정도관리방법

- 고체배지에서 배양된 균주를 이용하여 균액을 만들고 0.5 McFarland 탁도에 맞춘다.
- 결핵균의 경우 균액 10 μ L와 생리식염수 4,990 μ L를 혼합하여 1:500 희석용액을 만들고, 희석용액 0.5 mL를 MGIT 튜브에 접종한다. BacT/ALERT를 사용하는 경우 생리식염수를 혼합하여 10⁴ CFU/mL 희석용액을 만들고, 희석용액 0.5 mL를 MP bottle에 접종한다.
- MGIT 960 또는 BacT/ALERT 3D에서 배양 후 양성 검출 시간을 확인한다.
- 정도관리 결과 판정: 양성 검출 허용 시간 내에 양성 검출 되는 경우 '적합'으로 평가한다.
- 정도관리 결과 이상 시 적합한 결과가 나올 때까지 결과보고를 보류한다. 새로운 시약, 새 균주로 검사를 반복한다. 정도관리가 적합할 경우 검사결과를 보고한다.
- 음성대조를 위해서 검체 대신 멸균 증류수로 검사를 시행한다. 배양기간 동안 균 증식이 검출되지 않는 경우 '적합'으로 평가한다.

3) 검사절차

[BACTEC MGIT 960 배양법]

(1) 검체 전처리

- ① NALC-NaOH법 참조
- ② NaOH법, Z-TSP법 그리고 CPC-NaCl법은 MGIT 배양에 적용해서는 안 된다.

(2) 검체 접종

- ① 동결건조된 MGIT PANTA 병에 MGIT growth supplement 15 mL를 넣어 잘 섞어준다.
 - 제조 후 냉장에서 5일간 보관가능함.
- ② MGIT 튜브에 적절한 label을 붙인다.
- ③ 무균적으로 0.8 mL의 PANTA/Growth supplement 혼합시약을 MGIT 튜브에 넣는다.
 - 검체 접종 후에 첨가하여서는 안됨.
- ④ 전처리된 검체 0.5 mL를 MGIT 튜브에 넣는다.
 - 각 검체별로 새 피펫 혹은 피펫 팁을 사용함.
 - 0.5 mL 이상 접종해서는 안 됨.
- ⑤ 즉시 뚜껑을 닫은 후 튜브를 몇 차례 뒤집어서 섞는다.
- ⑥ 접종된 MGIT 튜브를 MGIT 960에 바코드 스캔한 후 녹색등이 켜진 지정 위치에 넣고 42일간 배양한다.

(3) 기기 양성판정처리

- ① 기기 전면에 양성 검출등이 켜지면 해당 배양 양성 의심 MGIT 튜브를 꺼낸다.
- ② 양성 튜브를 잘 섞은 후 배양액을 깨끗한 슬라이드에 도말한다.
- ③ 슬라이드를 공기 중에서 건조 시킨 후 고정을 한다.
- ④ Ziehl-Neelsen염색을 하여 항산균의 존재를 확인한다.
- ⑤ Ziehl-Neelsen염색에서 항산균이 관찰되면 결핵균 감별검사를 시행하고 감수성검사 등을 위해 고체배지에 계대배양한다.
- ⑥ 항산균 관찰되지 않고 세균 오염인 경우 오염제거를 다시 하여 새로운 MGIT 튜브에 접종한다.
- ⑦ 항산균 관찰되지 않고 세균 오염도 아닌 경우 MGIT 튜브를 5시간 이내로 다시 삽입하여 배양을 계속한다.
 - 1-3일 후에 염색을 다시 시행한다.

(4) 오염된 MGIT 튜브 처리방법

- ① 오염된 MGIT 튜브를 잘 섞는다.
- ② 무균적으로 배지 전체를 50 mL 튜브에 옮긴다.
- ③ 4% NaOH 용액을 동량 넣는다.
- ④ 이 후의 과정은 검체전처리 지침과 같고 전처리 과정을 거친 검체 0.5 mL를 새로운 MGIT 튜브에 접종한다.
- ⑤ 새로운 MGIT 튜브를 MGIT 960에서 배양한다.

(5) 주의사항

- ① Growth supplement를 첨가할 때 오염이 발생할 가능성이 높다.
- ② 모든 작업은 생물안전작업대에서 시행한다.
- ③ 여러 개의 배지를 한꺼번에 열고 작업하지 않는다.
- ④ MGIT 튜브를 열고 작업하는 시간을 최소로 한다.
- ⑤ 튜브마개를 단단히 막는다. 그렇지 않을 경우 형광검출에 영향을 줄 수 있다.
- ⑥ 검체를 0.5 mL보다 많이 접종하면 배지 pH에 변화를 줄 수 있어 위양성의 원인이 될 수 있다. 또한 오염발 생도 증가한다.

[BacT/ALERT MP 배양법]

(1) BacT/ALERT MP bottle 준비

- ① 냉장보관 중인 MP bottle의 파손이나 오염이 없는지 육안으로 확인한다.
- ② 사용 30-60분 전에 꺼내어 실온에 두고 적절한 label을 붙인다.
- ③ Bottle의 뚜껑을 제거하고 알코올 솜 등으로 소독한 후 건조시킨다.

(2) MB/BacT Antibiotic Supplement (MAS) Kit 제조

- ① MAS는 항균제의 혼합물(amphotericin B, azlocillin, nalidixic acid, polymyxin B, trimethoprim, vancomycin)을 포함하고 있으며, reconstitution fluid는 oleic acid, glycerol, amaranth, bovine serum albumin으로 구성된다.
- ② MAS 병에 reconstitution fluid 10 mL를 무균적으로 첨가한 후 잘 섞는다(MAS가 남는 경우 냉장 보관하며 7일 안에 사용한다).
- ③ 무균적으로 주사기를 이용하여 MAS 0.5 mL를 MP bottle에 넣는다.
- ④ 전처리된 검체 0.5 mL를 주사기를 이용하여 MP bottle에 접종하고 잘 섞는다.
- ⑤ 접종된 MP bottle의 바코드를 스캔하고 Mycobacteria용 drawer 내 임의의 위치에 집어넣고 42일간 배양 한다.
- ⑥ 기기에서 양성 검출등이 켜지면 해당 배양 양성 의심 MP bottle을 꺼낸다.
- ⑦ 배양액으로 도말을 만들어 Ziehl-Neelsen염색을 시행한다.
- ⑧ Ziehl-Neelsen염색 양성이면 균종동정과 감수성검사를 위해 고체배지에 계대배양한다.
- ⑨ 기기에서 양성판정이나, 항산성 염색에서 항산균이 관찰되지 않고, 일반 세균 오염도 아닌 경우 고체배지 에 계대배양한 후 다시 BacT/ALERT 3D기기에 넣어 재배양한다.

4) 특수 검체배양

- 무균성 체액 (뇌척수액, 관절액, 흉수액, 복수액 등): 오염제거 방법 없이 액체배지에 접종이 가능하다. 오염이 의심되는 경우 오염제거를 할 수 있다.
- 혈액과 골수 등 혈성 검체: 혈성 검체를 이용한 항산균 배양은 MGIT 튜브 배양을 권장하지 않는다. BACTEC Myco/F Lytic 배지 또는 bioMérieux MB bottle에 혈액 3-5 mL를 접종 후 42일까지 배양한다.

5) 검사결과 보고

배양양성 시 도말검사를 시행하여 항산균 여부를 확인한다. 항산균으로 확인되면 "항산균 배양양성, 균종 동정 중"으로 보고한다. 균종동정에서 결핵균으로 확인되면 결과를 주치의에게 즉시 보고한다.

5. 검사 시 유의할 점

- 1) 배양 양성과 양성 검출 시간은 검체에 존재하는 항산균의 수, 검체의 질, 채취 방법, 검체 처리방법, 환자의 항결핵제 투약 경력 등에 영향을 받는다. 집락 모양과 색깔은 고체배지에서만 확인이 가능하다.
- 2) 액체배양에서 일반세균이 과증식되어 항산균의 증식을 억제할 수 있다. 액체 배양에서 여러 종류의 항산균이 혼재된 경우 신속발육균이 먼저 검출될 수 있다. 따라서 액체배양 양성 시 고체배지에 계대배양하는 것이 필요하다.
- 3) 액체배지(MGIT 튜브, MP bottle 등)는 영양 성분이 풍부하기 때문에 오염을 줄이기 위해서 엄격한 검체 전 처리과정이 필요하며 제조사에서 권장하는 검체 접종량을 지켜야 한다.
- 4) 액체배양에서 항균제(PANTA, MAS 등)의 사용으로 일부 항산균의 증식이 억제될 수 있다.

참고문헌

1. Section 7.3 Soild Media for Isolation and 7.4 Liquid media for Isolation. LV Lee, S. Siddiqi et al., Clinical microbiology procedures handbook, 3rd ed., ASM Press, 2010.



그림 1. MGIT 960 액체배양기(BD).

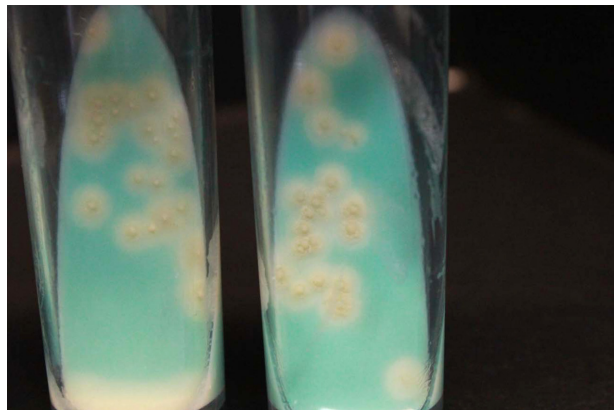


그림 2. LJ 배지에서 자란 결핵균(4주 배양).



그림 3. MGIT tube (A: 음성대조, B: 결핵균).

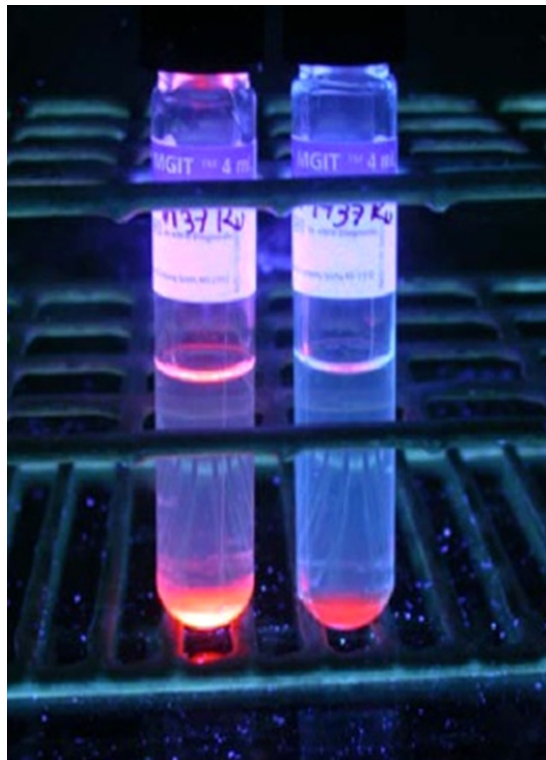
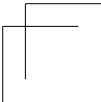
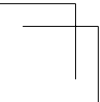
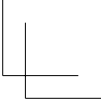
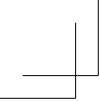


그림 4. 배양양성인 MGIT tube (Wood's lamp를 이용하여 형광을 확인함).



그림 5. Middlebrook 7H11 한천배지에서 자란 결핵균(3주 배양).

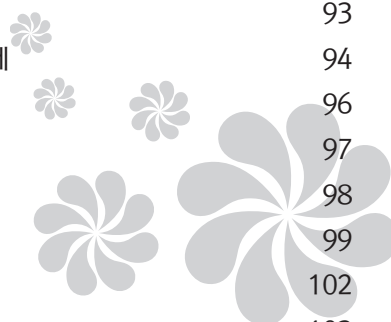


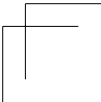
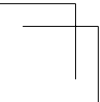
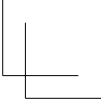
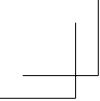


V. 결핵균 동정 검사

결핵검사지침

1. 가이드라인	75
1.1. 표현형적 방법	75
1.2. 유전형적 방법	78
1.3. <i>M. tuberculosis</i> complex 세부균종 동정	80
2. 검사절차	81
2.1. 전통적 생화학 검사	81
2.2. Arylsulfatase 검사	81
2.3. Catalase 검사	83
2.4. 성장 속도와 색소 생성	85
2.5. Crystal violet을 뺀 MacConkey 한천배지에서 성장 여부	87
2.6. 철 섭취	88
2.7. 5% 염화나트륨 내성	89
2.8. 니아신 축적	90
2.9. 질산염 환원	91
2.10. Pyrazinamidase	93
2.11. Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 억제	94
2.12. Tellurite 환원	96
2.13. Tween 80 가수분해	97
2.14. Urease (Wayne 법)	98
2.15. Gen-Probe AccuProbe를 이용한 동정 검사	99
2.16. 기타 검사법	102
2.17. 참고문헌	103





V.

결핵균 동정 검사

1. 가이드라인

MTBC (*Mycobacterium tuberculosis* complex)의 동정을 위주로 서술하였으며, 비결핵항산균을 포함하는 항산균 일반에 대한 동정 방법도 일부 포함시켰다.

1. 표현형적 방법

1) 전통적 검사

(1) 성장 속도

성장 속도는 임상 검체를 접종한 1차 배양 배지에서도 측정할 수 있지만, 검체 전처리가 너무 강하게 되었거나, 배지 뚜껑이 꼭 닫혀서 호기성 조건이 제대로 되지 못하거나, 배양 온도가 잘못되었거나, 검체 내 균수가 적을 경우 성장 속도의 측정에 오류가 생길 수 있다. 이 때문에 성장 속도를 측정하기 위해서는 이 검사를 따로 정확하게 수행하는 것이 가장 좋다. 신속발육 항산균은 7일 이내에 자라는 것으로 정의되어 있지만, 종종 3-5일만에 완전히 성숙된 집락을 볼 수 있다.

(2) 집락의 형태

집락의 형태를 주의 깊게 관찰하면, 균종 동정, 오염의 확인, 서로 다른 항산균의 혼합배양 확인 등에 도움이 될 수 있다. 집락 모양은 Middlebrook 한천배지에서 가장 잘 볼 수 있으나, 계란배지도 유용할 수 있다. 희석된 균액을 배지에 접종하여 집락들이 따로 분리되도록 하는 것이 중요하다. 집락이 뭉쳐 있으면 형태적 특징을 제대로 보기 어렵다. 집락을 해부 현미경으로 관찰하는 것이 가장 좋다. 전형적인 결핵균의 집락은 거칠고(rough) 말라 보이며(dry), 담황색 또는 황갈색(buff, tan)이다.

(3) 색소 생성

색소 생성은 어떤 동정 검사를 시행할지 결정하는 데에 도움을 줄 수 있다. 색소는 1차 배양에서 관찰할 수도 있지만, 따로 계대배양하면 가장 잘 볼 수 있다. 뚜껑이 꼭 닫혀서 산소가 들어가지 못하거나, 접종량이 너무 많거나, 배지 튜브 내 습기가 너무 많거나 하면 색소가 제대로 생성되지 않을 수 있다. 예전에는 균종 동정 시 색소 생성을 많이 활용했으나, 최근에는 대부분의 검사실에서 다른 동정 지표를 더 자주 이용한다. 그러나 색소를 생성하는 것은 MTBC를 배제하는 데 유용한 지표이다(MTBC는 색소를 생성하지 않음).

(4) 현미경 관찰 시 형태

배지에서 집락이 자라면, Ziehl-Neelsen이나 Kinyoun 염색을 시행하여 항산성을 확인하고, 비항산성 오염균과 섞였는지 알아보고, 현미경으로 형태학적 특징을 관찰해야 한다. 그러나 형태학적 특징만으로 배양된 항산균을 확실하게 동정하기는 어렵다. 예를 들어, 결핵균은 cord를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이것은 개개의 결핵균이 밧줄과 같은 특징적인 형태로 배열하는 것인데, 결핵균에만 있는 특징은 아니다. 드물게 *M. kansasii*와 *M. fortuitum*도 이러한 모양을 보일 수 있다. 형태적 특징만으로는 어떠한 예비 동정도 하면 안 된다. 이 단계에서는 1차 배지에서 항산균이 배양 분리가 확인되었다는 것만 보고할 수 있다.

(5) 전통적 생화학 검사

결핵균의 동정에 니아신(niacin) 축적, 질산염(nitrate) 환원, thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 억제 등의 생화학적 검사들이 도움이 될 수 있다. 그러나 표준 검사실을 제외하면 최근 이러한 생화학적 검사는 잘 이용되지 않는다.

결핵균뿐 아니라 비결핵항산균을 포함한 항산균 전반의 동정에 있어서 유용한 생화학적 검사로는 arylsulfatase 검사, catalase 검사, crystal violet을 뺀 MacConkey 한천에서 성장 여부, 철 섭취, 염화나트륨 내성, pyrazinamidase, tellurite 환원, Tween 80 가수분해, urease 검사 등도 있다.

(6) 생화학 반응과 표현형의 해석

여러 요소들을 고려하여, 각 기관의 경험에 맞추어 결정을 하는 것이 중요하다. MTBC의 각 균종을 동정할 것인지 아니면 그냥 MTBC가 존재한다고 보고하면 충분할 것인지를 결정해야 한다. 분자적 검사 방법의 출현과 더불어 더 많은 항산균 균종이 알려지고 있는데, 각 기관마다 드문 균종 또는 새로운 균종을 인지할 수 있는 기준을 확립하는 것이 중요하다. 생화학 반응의 변이는 드문 일이 아니기 때문에, 각 기관마다 그 환자군에서 배양되는 균을 대상으로 생화학 반응의 예상 양성률을 확립해야 한다.

(7) 전통적인 검사법에 근거하여 새로운 균종이나 드문 균종 인지

모든 생화학 검사 결과가 정확히 맞지 않고, 형태학적으로 이전에 알려진 것과 일치하지 않거나, 약제 감수성 양상이 전형적이지 않다면, 동정된 균종이 맞는지 의심해야 하고 표준 검사실로 의뢰해야 한다.

(8) 생화학 반응의 양성률

각 기관은 각 균종에서 얻어진 생화학적 검사와 생리학적 검사 반응을 모니터하고 정리해야 한다. 예를 들어, 한 보고에 따르면 어떤 기관에서 *M. tuberculosis* 분리주의 98%가 니아신 검사 양성이었다고 한다. *M. tuberculosis*는 니아신 검사에서 대개 양성일 것으로 기대하지만, 예를 들어 1년에 200개의 결핵균 분리주를 동정하는 큰 검사실이라면 3-4개의 분리주에서는 니아신 반응이 음성일 수 있다. 생화학적 검사의 기존 보고된 양성 빈도와 해당 검사실의 양성 빈도를 비교하는 것은 전통적인 동정법에서 질 보증(quality assurance)에 도움이 된다.

2) 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)

항산균의 세포벽 지방산(마이콜산, mycolic acid) 분석은 항산균을 동정하는 하나의 방법이다. 극히 일부의 미생물만이 세포벽에 지방산을 가지고 있기 때문에 균종 수준까지 여러 가지 항산균을 동정하는 데에 이러한 특성이 이용된다. Reverse-phase HPLC는 이러한 동정법 중 하나이고, 전통적인 생화학적 검사법, DNA 소식자법, 핵산 증폭, 16S rRNA 염기서열 분석법과 병행하여, 혹은 그것들을 대체하여 사용할 수 있다. 그러나 HPLC는 임상 검사실에서 쉽게 할 수 있는 검사법은 아니다. 이 검사법은 대개 규모가 큰 검사실, 표준 검사실과 국가 공중 보건 검사실에서 사용된다.

마이콜산 HPLC를 시행하는 방법은 출판되어 있으며, HPLC Users Group이 미국 CDC와 협력하여 항산균 HPLC 패턴의 표준화와 동정에 대한 2개의 매뉴얼을 출판한 바 있다. 이들 자료는 CDC 웹사이트 <http://www.cdc.gov/ncidod/publicat.htm>에서 다운로드할 수 있다.

3) 면역크로마토그래피를 이용한 MTBC의 신속 동정

M. tuberculosis 특이 항원인 MPT64를 검출함으로써 배양 균주를 동정하는 간단한 면역크로마토그래피법이 최근 개발되었다. 이 원리에 기반한 상업화된 검사 시약이 배양 양성균주를 동정하기 위한 방법으로 사용될 수 있다. 액체나 고체배지에서 배양된 균주를 최소한의 조작만으로 검사할 수 있으며, 결과도 몇 분만에 나오는 장점이 있다. 검사가 간단하고 신속하므로, MTBC를 제외한 다른 균종을 동정하는 것이 우선시되지 않는 검사실에서 유용하게 사용될 수도 있다. 그러나 이 검사는 특히 액체배지에 적용할 경우 위음성 결과가 적지 않다(Int J Tuberc Lung Dis 2011;15:1475-1477). 따라서 MPT64 항원 검사는 고체배지 집락에만 적용하거나, 액체배지

에 적용할 경우 항원 검사 음성이 나오면 PCR 등 다른 방법으로 위음성이 아닌지 반드시 확인하는 것이 좋다. 또한 검사 결과에 영향을 주는 MPT64 유전자 돌연변이가 여러 나라에서 보고되었으나 빈도는 1% 미만이다.

2. 유전형적 방법

항산균의 균종 동정시 전통적으로 생화학적 방법이 표준법이였다. 그러나 새로운 마이코박테리아 균종수가 현저히 증가하였고, 이 새로운 종들을 구별할 수 있는 표현형적 특징이 거의 없기 때문에 최근에는 주로 분자 진단법으로 동정을 하게 되었다. 분자 진단법은 더 민감하고 신속하며 인력이 적게 들어 비용이 절감될 수 있다. 분자 진단법에는 유전자 소식자를 사용하는 교잡 반응 검사, 핵산 증폭을 이용하여 항산균을 임상 검체나 배양된 균주에서 직접 검출하는 방법, 핵산 증폭 후 염기서열 분석이나 제한효소 단편 분석(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 이용하는 방법 등이 있다.

1) Conventional PCR 및 real-time PCR

배양된 항산균 균주가 결핵균인지 여부를 확인하기 위해 conventional PCR 또는 real-time PCR을 이용할 수 있다. 상품화된 검사 시약이 다수 있으며, 이들 검사는 대부분 배양 균주가 MTBC인지 비결핵항산균인지만을 확인할 수 있고 비결핵항산균 내에서 균종 동정은 불가능하다. Conventional PCR은 시발체(primer)만 있고 소식자(probe)가 없으므로 real-time PCR보다 증폭 반응의 특이성이 떨어질 수 있고, 증폭 산물로 인한 오염이나 carry-over의 위험이 크므로 사용 전에 오염 방지 대책을 잘 세워두어야 한다.

2) 동정용 소식자(probe)의 사용

두 종류의 소식자가 상업적으로 이용 가능한데, in-solution hybridization법이나 solid format reverse hybridization법에 쓰인다. 고체배지에 자란 집락이나 항산균 양성인 배양액으로 검사를 시행할 수 있다.

① In-solution hybridization: In-solution 방식인 소식자의 경우, 균을 용해시켜 죽인 후에 핵산을 추출한다. 여기에 표지된(labeled) 특이적 RNA 소식자를 넣고 일정 시간 두어서 표적 핵산에 소식자가 결합하도록 한다(교잡 반응). 결합되지 않은 소식자를 제거하고, DNA:RNA hybrid를 화학발광법으로 검출한다. 이러한 교잡 반응 전에 핵산증폭 과정이 없기 때문에 배양이 양성이 확인되어도 교잡 반응을 진행하기 전에 24시간 이상 더 배양해서 균의 양이 충분히 되도록 하는 것이 권장된다(특히 액체 배양의 경우).

② Solid format reverse hybridization: Line probe 검사법의 경우 교잡 반응 전에 핵산증폭이 필요하다. 표지된 특이 소식자들이 붙어 있는 nitrocellulose strip에 증폭 산물을 반응시킨다. 표적 핵산이 존재했다면, 스트립

의 적절한 위치에 발색 반응이 나타나게 된다. 이 검사 방식은 특이적 소식자의 수를 늘릴 수 있고, 이를 통해 전체적인 균종 동정 능력을 향상시킬 수 있다.

3) DNA 염기서열 분석을 통한 항산균 동정

액체배지나 고체배지에서 항산균이 증식하면, 마이코박테리아 게놈의 특정 부위를 증폭하고 염기서열 분석을 함으로써 균종 수준까지 동정할 수 있다. 염기서열 분석을 통한 균종을 동정하기 위해서는 검사실 자체의 방법(in-house)이나 상품화된 검사키트를 통해 수기 혹은 자동화 방법을 이용할 수 있다. 많은 임상 검사실에서 검사실 자체의 방법을 시행하고 있으나, 모든 검사실에서 염기서열 분석을 할 수 있는 것은 아니다. 염기서열 분석을 할 수 있는 검사실이라고 하더라도 데이터베이스를 분석, 비교하여 잘 운영할 수 있는 경험 많은 검사자가 필요하다. 대부분의 일반적인 임상 검사실에서 염기서열 분석을 이용한 동정법을 개발하는 것은 불가능해서, 일부 검사실에서는 자체적으로 항산균 유전자를 증폭한 후 표준 검사실로 염기서열 분석을 의뢰하거나, 증폭과 염기서열 분석 모두 의뢰하여 동정하기도 한다. 표준 검사실은 증폭 방법에 맞는 염기서열 분석 방법을 수행해야 하며 임상 검사실은 결과를 해석할 수 있는 적절한 소프트웨어를 갖추어야 한다. 따라서 이러한 체계를 도입한다면 최종 동정은 검사를 최초로 의뢰하였던 검사실에서 해야 한다. 검사실에서 자체적으로 염기서열 분석법을 개발하여 사용한다면, 이미 확립된 데이터베이스를 사용하는 것을 권고한다.

염기서열 분석법에는 16S rRNA, *hsp65* 유전자, 23S-16S rRNA 혹은 ITS (intergenic spacer region), *tpoB* 유전자, IS6110 (*M. tuberculosis*의 직접 증폭 검사법에서 가장 많이 사용되는 repetitive insertion sequence로 MTBC에서만 나타남) 등이 이용된다. 그러나 이러한 염기서열 분석법 대부분이 MTBC에 속한 균종을 구분할 수 없다.

데이터베이스 등재 과정이 얼마나 잘 관리되느냐에 따라 데이터베이스의 완전성이 좌우된다. 이러한 정도 관리가 잘 되고 있는 데이터베이스를 사용해야 한다. 항산균 동정을 위해 염기서열을 비교할 수 있는 외부 데이터베이스로 RIDOM (Ribosomal Differentiation of Microorganisms - www.ridom-rdna.de)이 있다. GenBank/EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov)와 같은 비상업적 데이터베이스는 등재 과정에서 철저히 관리되지 않기 때문에 사용하는 데 문제가 있다.

4) PCR restriction enzyme analysis (PCR-REA)를 이용한 동정

PCR 증폭 후 그 산물을 제한 효소 처리하여 절편을 분석함으로써 균종을 동정할 수 있다. *hsp65*와 같은 특정 유전자를 PCR로 증폭한 뒤, 다양한 제한 효소로 증폭 산물을 처리한다. 제한 효소 처리로 생성된 산물을 전기영동하여 그 패턴을 기존에 알려진 균종의 패턴과 비교분석하여 균종을 동정하게 된다.

3. *M. tuberculosis* complex 세부균종 동정

MTBC를 동정하는 가장 빠른 방법 중 하나는 DNA probe법이다. 2시간 이내에 *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*로 구성된 MTBC를 동정할 수 있다. 각 검사실에서는 임상 의사 및 지역의 공중 보건 프로그램과 협력하여 MTBC까지만 보고할 것인지, 해당 검사실에서 자체적으로 각 균종을 분리 감별하여 보고할 것인지, 아니면 더 완전한 검사를 위해 표준 검사실로 균종 동정을 의뢰할 것인지 결정해야 한다. 이를 결정하기 위해서는 각 지역의 *M. tuberculosis*의 유병률, 다른 MTBC 균종의 발생 빈도, 특정 환자에서 BCG의 치료적 사용, BCG 예방접종, 저온살균을 하지 않은 유제품의 섭취 가능성, 이민하여 온 인구의 밀도를 고려해야 한다. 소변에서 MTBC가 배양된 경우에는, BCG를 배제하기 위해 균종 수준까지 추가로 동정해야 할 수 있다. 국내에서는 *M. tuberculosis*와 BCG 이외의 MTBC 균종에 의한 사람감염이 보고되지 않았다. BCG의 경우 대부분 BCG 접종 부작용이나 방광암 치료 같은 명확한 선행요인이 있다. 따라서 일반적으로 MTBC의 세부균종 동정은 필요하지 않다.

2. 검사절차

1. 전통적 생화학 검사

생화학적 검사를 하기 위해서는 생물안전작업대, 배양기, 수조, 보텍스교반기(vortex mixer), 멸균된 피펫과 나사마개 튜브가 필요하다. 전통적 생화학 검사를 실제 수행함에 있어 아래 수행절차로 부족한 부분이 있을 경우 뒤쪽의 참고문헌을 참고하도록 한다.

2. Arylsulfatase 검사

1) 검사 원리

Arylsulfatase는 tripotassium phenolphthalein의 방향족 고리와 황산(sulfate) 사이의 결합을 가수분해하는 효소이다. 유리된 phenolphthalein은 염기를 가했을 때 붉은 색이 된다. 3-day test는 신속발육균을 동정하고 감별하는 데 이용된다. 14-day test는 완속발육균과 일부 신속발육균의 동정에 도움이 된다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- Arylsulfatase stock substrate
- Arylsulfatase 액체배지: 3-day test
- Arylsulfatase 액체배지: 2-week test

(2) 시약

- 2 N sodium carbonate (Na_2CO_3)
- Arylsulfatase 색 표준 물질(color standards)
- 표준물질은 다음의 표 1에 따라 준비한다.

표 1. Arylsulfatase 표준 물질의 준비

튜브 번호	분량		해석
	Na ₂ HPO ₄	Phenol red	
1	4 mL	Stock solution 10방울	5+
2	4 mL	튜브 1에서 1 mL	4+
3	3 mL	튜브 2에서 2 mL	3+
4	3 mL	튜브 3에서 2 mL	2+
5	3 mL	튜브 4에서 2 mL	1+
6	3 mL	튜브 5에서 2 mL	±

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 3-day test 및 14-day test-용 배지 튜브에 7일 배양한 액체배지 0.1 mL이나 고체배양에서 활발하게 자란 집락을 접종 루프로 가득 딴 것, 또는 약간 혼탁한 균 부유액 0.1 mL를 접종한다.
- CO₂ 없는 배양기에서 35-37°C로 배양한다.
- 3일간 배양한 후 3-day test tube에 2 N sodium carbonate를 6방울 첨가한다.
- 14일 후에는 14-day test tube에 2 N sodium carbonate를 6방울 첨가한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: sodium carbonate를 가한 후 즉시 분홍색 또는 빨간색으로 변화
- 음성: 색 변화 없음

6) 정도 관리

(1) 3-day test

- 양성 대조: *M. fortuitum* ATCC 6841 (3-5+) 또는 *M. xenopi* (3-5+)
- 음성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950
- 접종하지 않은 배지와 시약: 무색

(2) 2-week test

- 양성 대조: *M. triviale* ATCC 23292 (4-5+)
- 음성 대조: *M. terrae* ATCC 15755 (0-2+)
- 접종하지 않은 배지와 시약: 무색

3. Catalase 검사

1) 검사 원리

Catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소이다. 이 때 산소는 기포로 나타난다. Catalase를 측정하는 데는 두 가지 방식이 있는데, (1) 68°C에서 catalase의 열에 대한 안정성과 (2) 생성된 catalase의 양(반정량 검사)을 측정하는 것이다. 일부 isoniazid 내성인 결핵균과 *M. bovis*를 제외한 모든 항산균은 catalase 활성을 보인다. 그러나 생성된 catalase의 양과 열 안정성은 다양하게 나타난다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- Dubos Tween 액체배지나 Middlebrook 7H9 액체배지
- 나사마개 튜브(25×150 mm)에 제조된 LJ 배지

(2) 시약

- 30% H₂O₂
- 10% Tween 80
- 10% Tween 80-30% H₂O₂ reagent
- 0.067 M 인산완충액

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

(1) 반정량 검사

- LJ 배지의 표면에 7일 배양한 액체배지 0.1 mL이나 고체 배양에서 활발하게 자란 집락을 루프로 가득 취하

여 접종한다.

- 뚜껑을 느슨하게 하고 8-10% CO₂ 배양기에서 37°C, 2주간 배양한다.
- Catalase 시약 1 mL를 가하고 5분간 관찰한다(이 시약은 아래 68°C 검사 부분에서 기술하는 것과 동일하게 제조).
- 배지 표면 위쪽으로 발생한 기포의 높이를 mm 단위로 잰다.

(2) 68°C 검사

- 균을 나사마개 튜브에 담긴 0.067 M 인산완충액(pH 7) 0.5 mL에 진하게 푼다.
- 68°C 수조나 heating block에 20분간 둔다.
- 실온으로 식힌다.
- Catalase 시약(10% Tween 80과 30% H₂O₂을 50:50으로 섞은 용액) 0.5 mL를 가한다. 튜브 뚜껑을 느슨하게 닫는다.
- 5분 후 판독한다. 음성 튜브는 버리기 전에 20분간 둔다.

5) 결과 판정과 보고

(1) 반정량 검사

- 약양성: <45 mm
- 강양성: ≥45 mm
- 음성: 기포 없음

(2) 68°C 검사

- 양성: 기포가 형성됨. 드물게 기포가 바닥에서 매우 소량 발생하여 표면에서는 기포가 형성되지 않을 수 있다. 이런 경우는 양성으로 기록한다.
- 음성: 기포 없음

6) 정도 관리

(1) 반정량 검사

- 대조 균주
 - High catalase: *M. fortuitum* ATCC 6841
 - Low catalase: *M. tuberculosis* ATCC 25177

- 기포 0 mm: 접종하지 않은 배지와 시약
- 대조 균주 배양에서 예상되는 결과가 나오지 않는 것은 보통 배양균이 오래된 것이거나 순도에 문제가 있기 때문이다. 활발하게 자라는 것만을 사용해야 하고, 순도를 자주 체크해야 한다. 오래된 배양균은 실제보다 낮은 catalase 결과를 보인다. 항산균 외의 다른 세균으로 오염된 배양균은 실제보다 높은 catalase 결과를 보일 수 있다.
- 새로 제조한 시약만을 사용해야 한다. 오래된 시약은 위음성 결과를 초래할 수 있다.
- 접종량이나 배양 기간이 부족하여 LJ 배지에서 충분히 자라지 못한 경우 위음성이 발생할 수 있다. 뚜껑을 꼭 닫고 배양해도 이럴 수 있다.
- 25×150 mm 튜브에 LJ 배지를 제조해야 가장 좋은 결과를 얻을 수 있다. 이 튜브는 균 성장에 필요한 표면적이 충분하고 기포 높이를 측정하기에도 좋다.
- 대조 배양균 결과가 예상과 다르면, 검사를 반복한다.

(2) 68°C 검사

- 양성 대조: *M. goodii* ATCC 14470
- 음성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177
- 시약만 있는 것은 기포가 전혀 발생하지 않음.

4. 성장 속도와 색소 생성

1) 검사 원리

항산균은 성장 속도, 선호 온도, 빛 노출에 따른 색소 생성에 의하여 두 그룹으로 나뉘어질 수 있다. 성장 속도, 선호 온도, 색소 생성은 LJ 배지에 새로 계대배양한 것을 관찰함으로써 알 수 있다. 이 배지가 선호되는 이유는 색 대조가 뚜렷하여 항산균 집락이 자라는지, 그 색깔이 어떤지 관찰하기 쉽기 때문이다. LJ에서 자라지 않는 항산균의 경우는 Middlebrook 7H10을 쓸 수 있다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- Dubos Tween 액체배지나 Middlebrook 7H9 액체배지
- LJ 사면배지

(2) 재료

- 멸균된 균접종용 막대
- 멸균된 파스퇴르 피펫
- 진한 갈색 포장지 또는 알루미늄 호일 (약 4×5 인치)
- 포장지는 배지 전체를 가릴 수 있을 만큼 커야 함.

(3) 장비

- 사면배지 rack
- 전등(60 W 전구)

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 검사하고자 하는 균집락을 Dubos Tween이나 Middlebrook 7H9 액체배지 튜브에 옮긴다.
- 보텍스교반기(vortex mixer)로 10초간 섞는다.
- 파스퇴르 피펫으로 6방울씩 IJ 사면배지 3개에 각각 접종한다.
- 사면배지 2개는 즉시 갈색 포장지나 알루미늄 호일로 씌운다.
- 튜브 뚜껑을 느슨하게 닫는다.
- 곁을 써서 빛을 차폐한 튜브 하나는 실온(20-25℃)에서 배양한다.
- 또 하나의 차폐한 튜브와 차폐하지 않은 튜브는 37℃, 8-10% CO₂에 배양한다.
- 차폐하지 않은 튜브는 3주 동안 매주 균 성장과 색소 생산 여부를 관찰한다. 차폐한 튜브는 싼 것을 3주간 제거하지 않는다.
- 자란 집락의 색깔을 기록한다. 항산균은 보통 색소가 없을 경우 담황색(buff) 내지 크림색으로, 색소가 있을 경우 노란색 내지 오렌지색으로 기술된다.
- 3주가 되면 포장지나 호일을 제거한다.
- 차폐했던 튜브에서 균 성장 및 색깔을 기록한다.
- 차폐하지 않은 배지에서 오렌지색 또는 노란색 색소가 나타났는데, 차폐한 배지에서 색소가 없는 경우는 색소가 없는 배지를 아래와 같이 빛에 노출시킨다.
 - 60 W 전등으로 10-12인치 거리에서 1시간 빛에 노출시킨다. 이후 배지를 원래 배양 온도에 둔다.

- 24시간 배양 후 색소 생산 여부를 관찰한다.

5) 결과 판정과 보고

- 빛을 차폐한 튜브와 차폐하지 않은 튜브 모두에서 색소 없음: 비발색균
- 빛을 차폐한 튜브와 차폐하지 않은 튜브 모두에서 색소 생성: 암발색균
- 빛을 차폐하지 않은 튜브에서 색소 생성, 차폐한 튜브에서 색소 없음: 광발색균

6) 정도 관리

- *M. terrae* ATCC 15755: 완속발육균, 실온(22-25°C)에서 균 성장이 미미하다(±). 빛이 있든 없든 색소 생성이 없다.
- *M. fortuitum* ATCC 6841: 신속발육균, 실온에서 잘 자란다. 빛이 있든 없든 색소 생성이 없다.
- *M. goodii* ATCC 14470: 완속발육균, 실온에서 약간 자란다. 빛이 있든 없든 오렌지색 색소를 생성한다.
- *M. kansasii* ATCC 12478: 완속발육균, 실온에서 매우 조금 자란다. 빛이 있으면 오렌지색 색소를 생성하나, 빛이 없으면 색소를 생성하지 않다가 빛 노출 후에 색소를 생성한다.

5. Crystal violet을 뺀 MacConkey 한천배지에서의 성장 여부

1) 검사 원리

이 방법은 신속발육균을 감별하기 위해 사용된다. 이 검사는 종종 3-day a/sulfatase test와 함께 사용된다.

2) 시약과 재료

- 배지: crystal violet을 뺀 MacConkey 한천 평판 배지

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 신속발육균을 7일 배양한 액체배지를 3 mm 점종 루프로 가득 취하여 crystal violet이 없는 MacConkey 에 점종한다. 이 때 집락 분리를 위해 선상 도말(streak)한다.
- CO₂ 없이 배양한다(28°C).

5) 결과 판정과 보고

*M. fortuitum*과 *M. chelonae* complex는 7일 이내에 균 성장을 보인다.

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. fortuitum* ATCC 12478
- 음성 대조: *M. phlei* ATCC 11758, 접종하지 않은 배지

6. 철 섭취

1) 검사 원리

*M. fortuitum*을 비롯한 일부 항산균은 ferric ammonium citrate를 산화철(iron oxide)로 전환시킬 수 있다. Ferric ammonium citrate 존재하에서 균을 배양했을 때 집락속에서 산화철은 녹슨 빛갈로 보인다.

2) 시약과 재료

- 배지: LJ 사면배지
- 시약: 20% ferric ammonium citrate

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- LJ 사면배지에 혼탁하게 보이기 직전 농도의 균 부유액을 접종한다.
- 균성장이 보일 때까지 배양한다.
- LJ 배지 1 mL 당 ferric ammonium citrate 용액 1방울을 첨가한다(보통 8방울).
- 다시 21일간 배양하면서 매주 판독한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 집락에 녹슨 갈색이 나타나고 배지는 황갈색(tan)으로 변색
- 음성: 색 변화 없음

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. fortuitum* ATCC 6841
- 음성 대조: *M. chelonae* ATCC 35751, 접종하지 않은 배지와 시약

7. 5% 염화나트륨 내성

1) 검사 원리

5% 염화나트륨을 포함한 배지에서 자랄 수 있는 항산균은 거의 없다. 하지만 대부분의 신속발육균(*M. chelonae*와 *M. mucogenicum*은 제외)과 *M. triviale*는 5% 염화나트륨 포함 배지에서 자란다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- NaCl 없는 LJ 사면배지
- 5% NaCl 첨가한 LJ 사면배지
- Dubos Tween 또는 Middlebrook 7H9 액체배지

(2) 재료

- 멸균된 균접종용 막대
- 멸균된 1 mL 피펫
- McFarland No. 1 탁도표준

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- LJ 사면배지에 자란 집락으로 혼탁하게 보이기 직전 농도의 균 부유액을 제조한다.
- 균 부유액 0.1 mL를 5% NaCl을 포함한 LJ 사면배지와 NaCl이 없는 대조 사면배지에 접종한다.
- 35-37°C, 8-10% CO₂에서 4주 동안 배양한다.
- 균 성장 여부를 매주 1번 판독한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: NaCl이 첨가된 배지에서 자람
- 음성: NaCl이 첨가된 배지에서 자라지 않고, 대조배지에서는 자람
- 무효: NaCl이 첨가된 배지와 대조배지에서 모두 자라지 않음

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. fortuitum* ATCC 6841
- 음성 대조: *M. gordonae* ATCC 14470

8. 니아신 축적

1) 검사 원리

모든 항산균은 자라면서 니아신(니코틴산, nicotinic acid)을 생산한다. 결핵균과 *M. simiae* 및 *M. chelonae* 일부 균주에서는 니아신이 niacin ribonucleotide로 대사되지 못하고 배지에 축적되므로, 배지에서 니아신을 추출하여 검출할 수 있다. 결핵균과 *M. bovis*를 감별하기 위해 니아신 검사만 해서는 안 되는데, *M. bovis*의 4%는 니아신 양성이기 때문이다. 또한 *M. tuberculosis*의 2%에서 니아신 검사 음성이었다는 보고도 있다. 니아신 축적 검사를 위해서 전통적으로 cyanogen bromide를 사용하였는데 독성이 매우 강한 물질이어서 상품화된 니아신 스트립으로 대체되었다.

2) 시약과 재료

(1) 시약

- Cyanogen chloride가 포함된 니아신 스트립(BD, Sparks, Md.)

(2) 재료

- 멸균된 나사마개 튜브(20×125 mm)
- 멸균된 파스퇴르 피펫
- 멸균된 5 mL 피펫

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- LJ 사면배지에서 4주 배양한 후 멸균 증류수나 생리식염수 1-1.5 mL를 가한다.
- 멸균된 접종용 바늘이나 루프로 배지 표면을 수 차례 베거나 찌른다.
- 액체가 배지 표면을 덮도록 튜브를 기울여 둔다.
- 니아신 추출을 위해 30분에서 2시간 방치한다.
- 추출액 0.6 mL를 따서 멸균된 튜브에 옮긴다.
- 핀셋으로 니아신 스트립을 튜브 바닥의 추출액에 넣는다. 이 때 스트립의 화살표는 아래쪽을 향하도록 한다.
- 튜브 뚜껑을 꼭 닫는다.
- 실온에 15-20분 둔다. 가끔 가볍게 흔들어 준다.
- 흰색 배경에서 튜브 바닥의 액체 색깔을 관찰한다. 스트립 자체에 생기는 색깔은 무시한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 노란색
- 음성: 무색

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177
- 음성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950, 접종하지 않은 배지와 시약

9. 질산염 환원

1) 검사 원리

결핵균 등 몇 가지 항산균 균종은 nitroreductase를 가지고 있어 질산염(nitrate)을 아질산염(nitrite)으로 환원시킨다. 질산염 환원 능력이 있으면, 질산염이 환원되어 생성된 아질산염이 적절한 시약과 반응하여 색깔을 나타낸다.

2) 시약과 재료

(1) 시약

- Nitrate substrate 액체배지

- Concentrated HCl과 멸균 증류수를 1:1로 섞은 용액 (질산염 시약 1)
- 0.2% sulfanilamide (질산염 시약 2)
- 0.1% β -N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (질산염 시약 3)
- Crystalline reagents (Lampe's method) [Kubica G and Wayne L. 1984. The Mycobacteria, a Sourcebook. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.]
- 질산염 환원 검사 색 표준물질(color standard)

(2) 재료

- 멸균된 나사마개 튜브(20×125 mm)
- 멸균된 파스퇴르 피펫
- 멸균된 5 mL 피펫

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 균집락을 루프로 가득 따서 nitrate 액체배지에 접종한다.
- 흔들어서 섞고, 35-37°C에서 2시간 배양한다.
- 시약 1을 1방울 가한다.
- 시약 2를 2방울 가한다.
- 시약 3을 2방울 가한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 분홍색 내지 짙은 빨간색
- 음성: 색 변화 없음. 최종 확인을 위해 소량의 아연 가루를 첨가하는데, 이 때 분홍색 또는 짙은 빨간색이 나타나면 음성 결과가 맞음.

6) 정도 관리

- 양성 대조(3+ 초과): *M. tuberculosis* ATCC 25177
- 음성 대조(0 또는 ±): *M. intracellulare* ATCC 13950

- 음성 대조(무색): 접종하지 않은 배지와 시약

10. Pyrazinamidase

1) 검사 원리

일부 항산균은 pyrazinamidase 효소를 가지고 있다. 이 효소는 pyrazinamide (PZA)를 탈아미노화시켜 pyrazinoic acid와 암모니아로 바꾸는데, ferrous ammonium sulfate를 가하여 검출할 수 있다. 결핵균의 PZA 내성 기전은 pyrazinamidase의 결핍으로 PZA의 활성 성분인 pyrazinoic acid가 생성되지 않기 때문이다. 그러므로 이 검사는 결핵균의 PZA 내성을 알아보기 위해 사용되어 왔다. 균이 pyrazinamidase 음성이면 PZA 내성인 것으로 볼 수 있다.

2) 시약과 재료

- 배지: pyrazinamidase substrate medium
- 시약: 1% ferrous ammonium sulfate

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 접종을 하지 않는 대조 튜브를 하나 포함시킨다. 사면배지에서 배양된 신선한 균 다량을 pyrazinamidase 검 사용 배지 표면에 접종한다(튜브 2개에 각각). 육안으로 쉽게 보일 정도로 충분히 많은 양의 균을 접종해야 한다.
- 35-37°C 온도에서 CO₂ 없이 배양한다.
- 4일 후 튜브 하나를 배양기에서 꺼내어 새로 제조한 1% ferrous ammonium sulfate 1.0 mL를 가한다.
- 위 튜브를 실온에 30분간 둔다. 그 후 오염균 성장을 막기 위해 2-8°C에 냉장한다.
- 4시간 후 한천에 분홍색 띠가 생겼는지 관찰한다. 흰 배경에서 튜브에 실내 불빛을 비춰 판독한다.
- 7일 배양한 후 두 번째 튜브(접종한 것)를 꺼내어 위와 마찬가지로 진행한다. 만약 위 (3)에서 4일째 검사가 양성이면 두 번째 튜브를 7일 동안 둘 필요는 없다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 분홍색 띠 형성
- 음성: 분홍 띠 형성 안 됨

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950
- 음성 대조: *M. kansasii* ATCC 12478, 접종하지 않은 배지와 시약

11. Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 억제

1) 검사 원리

결핵균과 대부분의 완속발육균은 1-5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 TCH에 내성이다. 이 검사로 니아신 양성인 *M. bovis*와 결핵균을 구별할 수 있는데, *M. bovis*가 저농도 TCH에 감수성이기 때문이다. 예외적으로 isoniazid 내성인 *M. bovis*에서 TCH에도 내성으로 나타날 수 있다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- 전통적 방법
 - Dubos Tween 또는 Middlebrook 7H9 액체배지
 - TCH 감수성 배지
- BACTEC 방법
 - BACTEC 12B 배지
 - TCH stock medium

(2) 재료

- 전통적 방법
 - 35-37°C, 8-10% CO₂ 배양기
 - 파스퇴르 피펫

- BACTEC 방법
 - BACTEC 460 장비
 - 1 mL 튜베르쿨린 주사기 및 바늘

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 7-10일 된 액체배양을 준비한다. 또는 약제가 없는 배지에서 자란 균으로 혼탁하게 보이기 직전 농도의 균 부유액을 제조한다.
- 멸균 생리식염수나 증류수로 1:1,000으로 희석한다.
- 멸균된 모세관 피펫으로 대조배지와 TCH 배지에 균 희석액 3방울씩 접종한다.
- 35-37°C, 5-10% CO₂에서 3주 배양한다.
- 대조배지와 TCH 배지의 균 성장을 비교하면서, 약제 감수성 검사 플레이트와 같은 방식으로 판독한다.

5) 결과 판정과 보고

TCH에서 균 성장이 대조 배지의 1% 미만이면 감수성인 것으로 판단한다.

6) 정도 관리

(1) 전통적 방법

- *M. bovis* ATCC 35734: 10 µg/mL TCH에 감수성
- *M. tuberculosis* ATCC 25177: 10 µg/mL TCH에 내성

(2) BACTEC 방법

- *M. bovis* ATCC 35734: TCH에 감수성
- *M. tuberculosis* ATCC 25177: TCH에 내성

12. Tellurite 환원

1) 검사 원리

대부분의 항산균은 tellurite를 tellurium로 환원시킬 수 있고, tellurium는 액체 배양에서 미세한 검은 침전물로 보인다. 그러나 이 환원 과정의 속도는 균종에 따라 다양하다. *M. avium* complex, *M. celatum*과 대다수 신속발육균은 액체 배양의 경우 3일 이내에 tellurite를 환원시킬 수 있다. 이 검사는 *M. avium* complex를 동정하는 데 가장 유용하다.

2) 시약과 재료

- 배지: glycerol이 포함된 Middlebrook 7H9 액체배지
- 시약: 0.2% potassium tellurite

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- Middlebrook 7H9 액체배지에 다량의 균을 접종한다.
- 35-37°C, 5-10% CO₂에서 7일간 배양한다. 액체배지 튜브 바닥에 침전물이 있어야 한다.
- 대조 및 시험 균주에 멸균된 potassium tellurite를 2방울씩 가한다.
- 흔들지 말고, 다시 35-37°C, 5-10% CO₂에서 3일간 배양한다.
- 3일째에 흔들지 않도록 주의하면서 튜브의 침전물을 관찰한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 금속 tellurium의 검은 침전물
- 음성: 검은 침전물이 없음. 밝은 갈색이나 회색의 침전물은 음성으로 간주함.

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950
- 음성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177, 접종하지 않은 배지와 시약

13. Tween 80 가수분해

1) 검사 원리

Lipase를 가지고 있는 균종은 Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate)을 가수분해하여 polyoxyethylene sorbitol과 oleic acid로 만든다. Tween 80 가수분해 검사는 잠재적으로 병원성인 완속발육균을 구별하는 데 유용하다. Tween 80은 지질로 작용하는데, neutral red 지시약과 결합하여 노란색을 나타낸다. 항산균의 lipase가 Tween 80을 가수분해하면, neutral red가 결합하지 못하게 되어 pH 7에서 붉은색으로 되돌아간다.

2) 시약과 재료

(1) 배지

- Tween hydrolysis reagent (Difco)
- 멸균 증류수

(2) 재료

- 멸균된 나사마개 튜브
- 멸균된 피펫

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 멸균된 탈이온수(deionized water) 1.0 mL에 Tween 80 hydrolysis substrate 농축액 2방울을 첨가한다.
- 사면배지 배양에서 활발하게 자라는 집락을 루프로 가득 취하여 위의 Tween 80 용액에 접종한다.
- 호기성 조건, 35-37°C, CO₂ 없는 배양기에서 배양하고, 1일, 5일, 10일에 관찰한다.
- 분홍 또는 붉은색(양성 반응)이 나타나는지 관찰한다. 판독시 튜브를 흔들지 않는다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 10일 이내에 분홍 또는 빨간색
- 음성: 10일 이후에도 노란색

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950
- 음성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177, 접종하지 않은 배지와 시약

14. Urease (Wayne 법)

1) 검사 원리

Urease 검사는 요소를 가수분해하는 능력에 따라 항산균을 감별한다. 이 때 이 목적만을 위해 만든 요소 액체 배지를 사용해야 한다.

2) 시약과 재료

- 배지: urea 액체배지

3) 균주(검체)

고체배지에 순수 배양된 항산균

4) 검사 방법

- 배양한 지 오래되지 않았고 활발하게 자라는 항산균을 요소 액체배지에 육안상 혼탁하게 되도록 접종한다.
- CO₂ 없이 35-37°C에서 7일까지 배양한다.

5) 결과 판정과 보고

- 양성: 짙은 분홍 또는 붉은색
- 음성: 색 변화 없음

6) 정도 관리

- 양성 대조: *M. kansasii* ATCC 12478
- 음성 대조: *M. intracellulare* ATCC 13950, 접종하지 않은 배지

15. Gen-Probe AccuProbe를 이용한 동정 검사

1) 검사 원리

핵산 교잡법은 상보적인 핵산 가닥이 적절한 환경에서 안정화된 이중 가닥 복합체를 형성하는 능력을 이용한 검사법이다. AccuProbe 시스템은 화학발광으로 표지되고, 표적 균주의 rRNA와 상보적인 단일 가닥 DNA 소식자를 사용한다. rRNA는 용해 시약과 초음파 파쇄(sonication) 과정을 거쳐 균으로부터 분리된다. DNA 소식자는 이후 표적 균주의 rRNA와 결합하여 안정적인 DNA:RNA hybrid를 형성하게 된다. 표지된 DNA:RNA hybrid는 GenProbe Leader luminometer로 측정된다.

2) 시약과 재료

(1) Gen-Probe에서 제공되는 재료

① 아래의 검사 키트에는 소식자 시약과 용해시약 튜브가 포함되어 있다.

- Gen-Probe *M. tuberculosis* complex culture identification test kit
- Gen-Probe *M. avium* complex culture identification test kit
- Gen-Probe *M. goodii* culture identification test kit
- Gen-Probe *M. kansasii* culture identification test kit

② 동정시약 키트

- 시약 1 (검체 희석제)
- 시약 2 (소식자 희석제)
- 시약 3 (선별 시약)

③ 검출 시약

- 검출시약 1 (0.001 N 질산에 0.1% 과산화수소를 섞음)
- 검출시약 2 (1N NaOH)

④ Gen-Probe 장비

- Gen-Probe Leader luminometer

(2) 제공되지 않는 재료

- 균 집락을 선택할 수 있는 멸균된 1 μ L 플라스틱 접종 루프, 플라스틱 바늘 또는 균집종용 막대
- 수조($60 \pm 1^\circ\text{C}$)
- Heating block ($95 \pm 5^\circ\text{C}$)

- 마이크로피펫($100\mu\text{L}$, $300\mu\text{L}$)
- 보텍스교반기(vortex mixer)
- 초음파 파쇄기(sonicator)
- 양성 및 음성 대조균 배양

3) 검체

Gen-Probe assay는 LJ나 Middlebrook과 같은 고체배지 혹은 액체배지에서 자라는 MTBC, *M. avium* complex, *M. gordonae*, *M. kansasii*를 동정하도록 고안되었다. 고체배지나 액체배지의 집락 모양을 관찰함으로써 어떤 소식자로 처음 검사를 할 것인지 결정할 수 있다.

4) 검사 방법

(1) 검체 준비

- 시약 1과 시약 2를 피펫으로 $100\mu\text{L}$ 씩 취하여 모든 용해시약 튜브에 넣는다. 액체 배양으로 검사할 경우는 시약 1을 첨가하지 않는다.
- 접종량(inoculum)
 - 고체배지법: 균을 일회용 $1\mu\text{L}$ 플라스틱 루프나 균점종용 막대로 취할 수 있다. 배지를 함께 따지 않도록 한다.
 - 액체배지법: 배양액 $100\mu\text{L}$ 을 피펫으로 취하여 용해 시약 튜브에 넣는다.
 - 용해 시약 튜브의 뚜껑을 닫고, 보텍스교반기로 섞는다.

(2) 검체 용해

- 제조사의 지시에 따라 15분간 초음파 파쇄한다.
- 용해시약 튜브를 heating block ($95\pm 5^\circ\text{C}$)에 10분간 둔다.

(3) 교잡 반응

- 용해된 검체 $100\mu\text{L}$ 을 피펫으로 취하여 소식자 시약 튜브에 넣는다.
- 소식자 시약 튜브의 뚜껑을 닫고 $59.5\sim 60^\circ\text{C}$ 수조나 heating block에서 15분간 항온한다. $59.5\sim 60^\circ\text{C}$ 가 유지 되도록 교잡 반응의 전 과정에서 온도를 잘 감시해야 한다.

(4) 선별(selection) 및 검출

- 수조에서 소식자 시약 튜브를 꺼낸다. 각 튜브에 시약 3 (선별 시약)을 300 μ L 가한다. 뚜껑을 닫고 보텍스 교반기로 섞는다.
- 튜브를 60°C 수조에 MTBC 소식자는 10분간, *M. kansasii* 소식자는 8분간, *M. gordonae*와 *M. avium* complex 소식자는 5분간 둔다.
- 수조에서 튜브를 꺼내어 실온에 최소 5분간 둔다. 1시간 이내에 luminometer에서 결과를 판독한다.

5) 결과 판정과 보고

(1) 결과 판정

- 양성: 신호 강도가 30,000 RIU 이상이면 양성으로 간주한다.
- 음성: 신호 강도가 30,000 RIU 미만이면 음성으로 간주한다.
- 20,000에서 29,000 RIU 사이의 값인 경우 재검한다.

(2) 보고 방법

- 결과값이 양성이면 다음과 같이 보고한다.
 - “Positive for *M. tuberculosis* complex identified by DNA probe technology” 또는
 - “Positive for *M. avium* complex identified by DNA probe technology” 또는
 - “Positive for *M. kansasii* identified by DNA probe technology” 또는
 - “Positive for *M. gordonae* identified by DNA probe technology”
- 모든 소식자에 대해 음성이면 다음과 같이 보고한다.
 - “Acid-fast bacilli present; identification to follow.”

6) 정도 관리

(1) 양성 대조와 음성 대조의 검사주기

양성 대조와 음성 대조는 매 검사마다 포함되어야 한다. 아래의 균들을 대조 균주로 사용하며 환자 배양 검체와 같은 방법으로 검사한다.

① MTBC 배양 동정 검사

- 양성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177
- 음성 대조: *M. avium* ATCC 25291

② *M. avium* complex 배양 동정 검사

- 양성 대조: *M. avium* ATCC 25291

- 음성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177

③ *M. gordonae* 배양 동정 검사

- 양성 대조: *M. gordonae* ATCC 14470

- 음성 대조: *M. scrofulaceum* ATCC 19981

④ *M. kansasii* 배양 동정 검사

- 양성 대조: *M. kansasii* ATCC 12478

- 음성 대조: *M. tuberculosis* ATCC 25177

(2) 수행능력 검사

삼중수소 표준물질이 Leader 장비내 광학 계통의 수행능력(performance)을 검사하기 위해 사용된다. 예상 값에 대한 측정값 평균의 비율이 0.95에서 1.05 사이여야 한다.

(3) 정도관리 결과

양성 값은 30,000 RIU를 넘어야 하고, 음성 값은 10,000 RIU 미만이어야 한다.

7) 제한점

- (1) 이 방법은 고체배지나 액체배지에서 배양된 신선한 균에 적용하는 것이다. 임상 검체(소변, 대변, 호흡기 검체 등)에 직접 이 방법을 적용하는 것은 그 유효성이 입증되지 않았다.
- (2) 모든 AccuProbe 배양 동정 검사의 결과는 다른 검사 결과 및 임상적 정보와 함께 해석해야 한다.
- (3) AccuProbe *M. tuberculosis* complex 동정 검사로 *M. tuberculosis* complex 내에서 균종을 감별하지는 못한다.

16. 기타 검사법

표현형 검사법으로서 결핵균 특이적인 MPT64 항원을 검출하는 면역 크로마토그래피 방법, 유전형 검사법으로서 conventional 및 real-time PCR 방법, line probe assay 방법, PCR 후 염기서열 분석 방법, PCR 후 RFLP 방법 등은 여기서 다루지 않는다. 이 방법들의 자세한 수행 절차는 상업적으로 이용 가능한 다양한 개별 시약들의 사용 설명서를 각각 참조하도록 한다.

참고문헌

1. Della-Latta P and Weitzman I. 1998. Identification procedures from culture, p. 187-197. In H. D. Isenberg (ed.), Essential Procedures for Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D. C.
2. Della-Latta P. 2010. Procedures for identification from culture, p. 7.6.1.1-7.6.2.3. In L. S. Garcia (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd ed., vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Pfyffer GE, Palicova F, Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. 2011. Mycobacterium, p. 472-538. In J. Versalovic, K. C. Carroll, G. Funke, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and D. W. Warnock (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington, D.C.



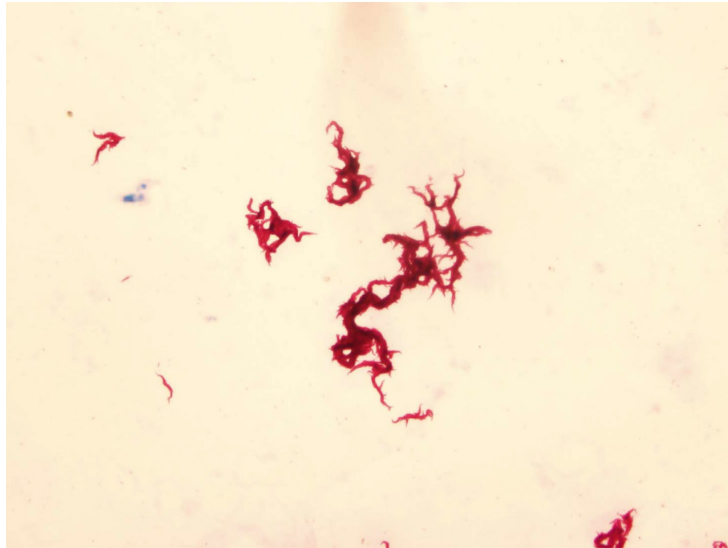


그림 1. MGIT 배양 양성에서 결핵균의 cord 형성(ZN 염색, 200배).



그림 2. *Mycobacterium avium* (비발색균).

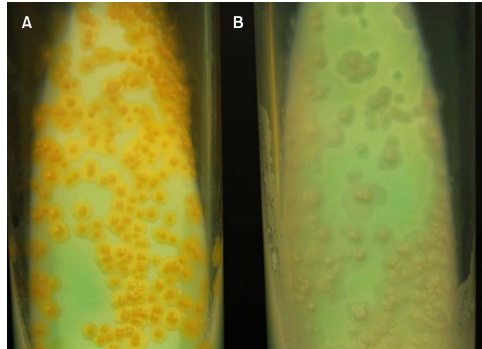


그림 3. *Mycobacterium kansasii* (A: 빛 노출 후, B: 빛 노출 전) (광발색균).



그림 4. *Mycobacterium gordonae* (암발색균).

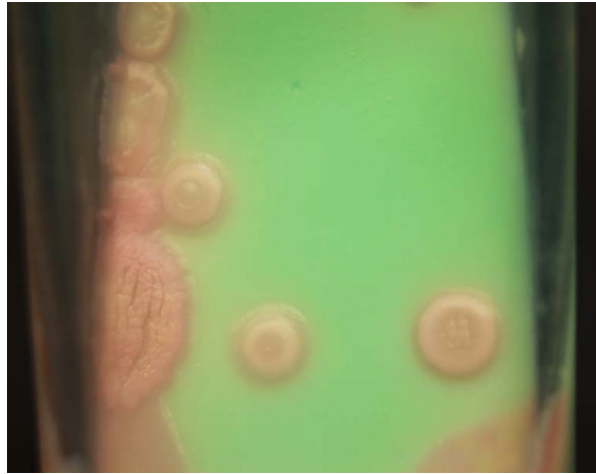
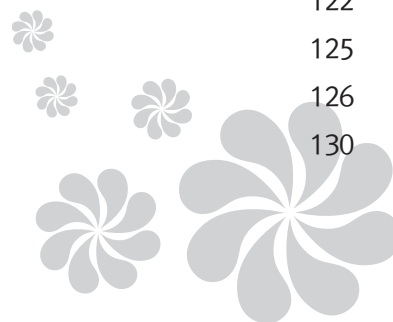


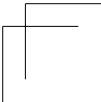
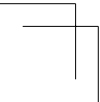
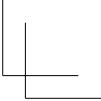
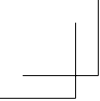
그림 5. *Mycobacterium abscessus* (신속발육균).

VI. 항결핵제 감수성검사 (Antituberculosis Drug Susceptibility Testing)

결핵검사지침

1. 가이드라인	109
1.1. 항결핵제 내성	109
1.2. 항결핵제 감수성 검사의 원리	109
1.3. Pyrazinamide (PZA) 약제 감수성 검사	112
1.4. 국내 항결핵제 감수성 시험 현황	112
1.5. 검체	113
1.6. 정도관리	113
1.7. 결과 및 해석	114
1.8. 결과보고 및 검사의 한계와 주의점	115
1.9. 참고문헌	116
2. 검사절차	117
2.1. LJ배지 절대농도법(결핵연구원 M-kit)	117
2.2. LJ배지 내성비율법	120
2.3. 한천배지 내성비율법	122
2.4. 판정 및 보고	125
2.5. MGIT 960 감수성 시험	126
2.6. Pyrazinamidase 검사(PZase test, Wayne test)	130





VI. 항결핵제 감수성검사 (Antituberculosis Drug Susceptibility Testing)

1. 가이드라인

1. 항결핵제 내성

결핵균은 유전자의 자연돌연변이(spontaneous mutation)에 의해 약제내성이 발생하며 인체 내 존재하는 결핵균 중 소수는 약제별로 내성을 지니고 있다. 약제 내성을 유발하는 돌연변이는 각 약제에 따라 일정한 비율로 발생하는데 예를 들어 결핵균이 isoniazid에 대한 내성이 발생할 확률은 약 백만 분의 일(10^{-6}) 정도이다. 그러나 부적절한 치료에 의해서 이러한 소수의 내성균이 다수를 차지하여 내성결핵으로 진행된다. 이를 획득내성(acquired resistance)이라고 하며, 약제내성 결핵균에 감염되어 발생한 내성을 일차내성(primary resistance)이라고 한다. 내성결핵은 치료가 힘들고 다른 사람에게 내성결핵균을 전파시킬 수 있기 때문에 결핵관리에서 중요하며 따라서 항결핵제 감수성 시험은 내성결핵을 검출하여 적절한 치료를 받게 하고 추가적인 내성결핵의 발생 및 전파를 예방하는데 필수적인 검사이다.

최근 질병관리본부 결핵 진료지침에 의하면 항결핵제 감수성 시험은 모든 결핵환자의 첫 배양 분리 균주에 대해 실시하며 3개월 이상 치료에도 배양 양성이거나 임상적으로 치료 실패가 의심되는 경우에는 다시 시행하는 것을 권고하고 있다.

2. 항결핵제 감수성 검사의 원리

1) 항결핵제 감수성 검사의 원리 및 종류

전통적인 약제 감수성검사는 정해진 농도의 항결핵제가 포함 또는 비포함된 배지에 배양된 결핵균을 접종하여 결핵균이 자라는 양상을 보고 약제내성 여부를 판정하는 방법으로 일반적으로 기준농도(critical concentration)의 약제 포함 배지에서 대조 배지보다 1% 이상 증식을 보이는 경우 내성으로 판정한다. 검사방법

으로 절대농도법(absolute concentration method), 내성비율법(proportion method), 내성비례법(resistant ratio method) 그리고 자동화 액체배양시스템을 이용한 감수성 검사 등이 있다. 내성비율법이 기준검사법으로 여겨지고 있으며 전세계적으로 가장 많이 이용되는 검사법이다. 국내에서는 절대농도법이 주로 이용되고 있으며 최근 액체배양의 사용증가와 더불어 자동화 액체배양시스템을 이용한 감수성 검사를 시행하는 검사실이 늘고 있다.

2) 절대농도법(absolute concentration method)

IJ 배지를 이용한 절대농도법은 표준 결핵균(*M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294)이나 결핵 치료력이 없는 환자들로부터 분리된 감수성인 야생주 등의 발육을 억제시킬 수 있는 약제별 최저 농도를 설정하고 이 농도의 약제 포함배지에서 20개 균집락 (1%) 이상 발육 시 내성으로 판정하는 방법이다. 최소억제농도를 측정할 수 있는 장점이 있고 접종 균량에 따라 결과가 영향을 많이 받기 때문에 표준화된 균액 접종이 중요하다.

3) 내성비율법(proportion method)

최소 2개 이상 희석 배율이 다른 균액을 약제배지와 대조배지에 접종하여 전체 결핵균 중에서 내성인 결핵균의 비율을 계산하는 방법이다. 기준 농도의 약제를 포함한 배지에서 자란 집락수를 대조배지에서 자란 집락수로 나누어 그 비율이 1% 이상이면 대개 임상적으로 유의할 만큼 내성이 생긴 것으로 판단하게 된다.

4) 내성비례법(resistant ratio method)

시험균의 약제별 최소억제농도(MIC)를 표준 결핵균 H37Rv의 최소억제농도 비에 따라 내성여부를 결정하는 방법으로 그 비가 8 이상이면 내성, 2 이하이면 감수성으로 판정하며 4일 때는 재검을 실시한다.

5) 자동화 액체배양을 이용한 감수성 시험(automated liquid culture system)

기본적인 원리는 내성비율법에 근거하며 항결핵제를 포함한 배지와 대조배지간 증식을 비교하여 1% 이상의 내성균을 검출할 수 있는 방법이다. 현재 BACTEC MGIT 960 (BD, USA)이 널리 사용되고 있으며 고체배지를 이용한 통상 감수성 시험에 비해 빠른 결과를 얻을 수 있으나 비용이 많이 드는 것이 단점이다.

6) 직접감수성 검사

항결핵제 감수성 검사는 검체에 따라 균집락을 이용하는 간접감수성 검사와 객담 검체를 이용하는 직접감수성 검사로 구분한다. 직접법은 배양과 동시에 약제감수성검사가 수행되므로 검사시간이 단축되고 환자 병변내 내성균의 분포상태를 비교적 잘 반영할 수 있는 장점이 있다. 그러나 도말 양성 검체에만 적용할 수 있고 균 집 종량을 조정하기 어렵다. 또한 오염 등으로 인해 검사실패 비율이 높은(10-15%) 단점 때문에 잘 이용되지는 않

는다.

7) 항결핵제와 기준농도

기준농도(critical concentration)는 결핵약에 노출되지 않은 야생형(wild-type) 균주의 95%를 억제하지만 치료에 반응하지 않는 환자에서 분리된 균은 억제하지 않는 가장 낮은 농도를 의미한다. 기준농도는 항결핵제 감수성 시험법과 배지에 따라 다르며(표 1) 일반적으로 기준농도의 약제 포함 배지에서 대조 배지보다 1% 이상 증식을 보이는 경우 내성으로 판정한다.

항결핵제들은 항결핵 효과와 작용 기전에 따라 5개 군으로 나눌 수 있고(표 2), 초치료 결핵에 사용되는 일차 항결핵제와 이차 항결핵제에 대해 감수성 검사를 실시한다. 일차 항결핵제는 모두 시험하는 것이 권장되며 특히 isoniazid와 rifampicin에 대해서는 반드시 감수성을 확인하여 다제내성결핵(multidrug-resistant TB, MDR-TB) 여부를 확인해야 한다. 이들 약제에 내성인 경우 이차 항결핵제에 대해 감수성 검사를 실시한다. 이차 항결핵제의 경우 전통적으로 이용되는 약제 외 levofloxacin, moxifloxacin과 같은 새로운 약제에 대해서도 검사하며, fluoroquinolone계 약제 중 최소 하나에 대해서 검사한다. Aminoglycoside의 경우 amikacin과 kanamycin의 교차내성 비율이 높기는 하지만 둘 다 검사하는 것이 권장된다.

표 1. 감수성검사 배지별 항결핵제 기준농도(critical concentration)

Drugs	Recommended critical concentrations ($\mu\text{g/mL}$)			
	LJ	7H10	7H11	MGIT 960
Isoniazid	0.2	0.2 (1.0)*	0.2 (1.0)	0.1 (0.4)*
Rifampicin	40.0	1.0	1.0	1.0
Ethambutol	2.0	5.0 (10.0)*	7.5	5.0 (7.5)*
Streptomycin	4.0	2.0 (10.0)*	2.0 (10.0)*	1.0 (4.0)*
Pyrazinamide	NR	NR	NR	100.0
Kanamycin	30.0	5.0	6.0	2.5
Amikacin	40.0	4.0	—	1.0
Capreomycin	40.0	10.0	10.0	2.5
Ciprofloxacin	2.0	2.0	2.0	1.0
Ofloxacin	2.0	2.0	2.0	2.0
Levofloxacin	—	1.0	—	1.5
Moxifloxacin	—	0.5	0.5	0.25
Ethionamide	40.0	5.0	10.0	5.0
Prothionamide	40.0	—	—	2.5
PAS	1.0	2.0	8.0	—
Cycloserine	40.0	NR	NR	NR
Linezolid	—	—	—	1.0

NR, Not recommended.

*High concentration.

표 2. 항결핵제의 분류*

군(group)	항결핵제
1군(경구용 일차 항결핵제) 효과가 좋고 부작용이 적어서 초치료 시 선택되는 경구용 약제	이소니아지드(Isoniazid, H) 리팜핀(Rifampin, Rifampicin, R) 에탐부톨(Ethambutol, E) 피라진아미드(Pyrazinamide, Z) 리파부틴(Rifabutin, Rfb [†])
2군(주사제) 효과가 좋으나 사용하기 불편하므로 약제내성이나 부작용으로 일차 항결핵제를 사용할 수 없을 때 선택되는 약제	카나마이신(Kanamycin, Km) 아미카신(Amikacin, Amk) 카프레오마이신(Capreomycin, Cm) 스트렙토마이신(Streptomycin, S)
3군(퀴놀론계 약) 항결핵 효과가 좋으므로 결핵균이 감수성을 보일 때 이차 항결핵제로 선택되는 약제	레보플록사신(Levofloxacin, Lfx) 모시플록사신(Moxifloxacin, Mfx) 오픈플록사신(Ofloxacin, Ofx)
4군(경구용 이차 항결핵제) 일차 항결핵제에 비해 항결핵 효과가 적고 부작용이 많아서 약제내성 결핵에서 이차 항결핵제로 선택되는 약제	프로치온아미드(Prothionamide, Pto) 시클로세린(Cycloserine, Cs) 파스(p-aminosalicylic acid, PAS)
5군 약효가 입증되지 않아 표준 요법으로 선택되지 않고 광범위 약제내성 등 난치성 결핵 시 제한적으로 선택되는 약제들로 전문가 자문이 필요한 약제	클로파지민(Clofazimine, Cfm) 리네졸리드(Linezolid, Lzd) Amoxicillin/Clavulanate 클래리스로마이신(Clarithromycin) 고용량 이소니아지드 이미페넴(Imipenem)

*결핵진료지침(2011) 발췌.

[†] 항레트로바이러스 약제를 사용 중인 HIV 감염인에서 결핵 초치료 시 선택.

3. Pyrazinamide (PZA) 약제 감수성 검사

일차 항결핵제인 PZA는 결핵균의 pyrazinamidase 효소에 의해 암모니아와 활성형인 pyrazinoic acid로 분해되어 작용을 한다. PZA는 산성 조건에서 작용하는 특성 때문에 통상적인 약제 감수성 방법을 적용할 수 없다. 따라서 MGIT 960을 이용한 PZA 감수성 검사와 결핵균의 pyrazinamidase 활성도를 보는 방법이 사용되고 있다.

4. 국내 항결핵제 감수성 시험 현황

우리나라에서는 대한결핵협회 결핵연구원이 최초로 항결핵제 감수성검사를 시작하였고, 현재 가장 많은 검사를 시행하고 있다. 그 외 결핵병원과 임상검사센터에서도 감수성검사를 시행하고 있다. 최근 액체배지의 사

용증가와 더불어 일부 3차 의료기관에서 액체배지 감수성검사를 시행하고 있으나 국내에서 가장 많이 이용되고 있는 검사법은 LJ 배지 절대농도법이며 특히 결핵연구원에서 생산하는 감수성검사 배지인 M-kit의 사용빈도가 높다.

표 3. 국내 항결핵제 감수성 검사 기관 현황 (2011년 12월 현재)

번호	검사 기관	검사 방법
1	결핵연구원	LJ 배지 절대농도법
2	국립마산병원	LJ 배지 절대농도법
3	국립목포병원	LJ 배지 절대농도법
4	서울특별시 서북병원	LJ 배지 절대농도법
5	서울의과학연구소	한천배지 내성비율법
6	녹십자의료재단	LJ 배지 절대농도법
7	네오딘	LJ 배지 절대농도법
8	삼광의료재단	LJ 배지 절대농도법
9	삼성서울병원	MGIT
10	서울보훈병원	MGIT
11	분당서울대학교병원	MGIT

5. 검체

항결핵제 감수성 시험은 고체배지에 순수 배양된 결핵균 집락으로 검사하며 오염되거나 여러 균주가 혼합된 경우, 직접 검체를 이용하는 것은 권장되지 않는다. 고체배지에서 2-4주 배양된 발육이 양호하고 충분한 집락(10개 이상)을 보이는 신선한 균주를 이용하여 계대배양 시 느리게 증식하는 내성 균주가 충분히 발육되지 않을 수 있으므로 일차 배양된 균주를 이용하는 것이 권장된다. 액체배양 후 고체배지를 이용한 감수성 검사를 시행할 경우 배양 양성 액체배지를 고체배지에 계대배양하여 자란 집락으로 감수성 검사를 시행하는 것이 원칙이다. 그러나 시간 단축을 위해서 액체배지를 직접 감수성 검사용 배지에 접종하기도 한다. 이 경우 접종량을 조정하기 힘들기 때문에 해석에 유의해야 한다.

6. 정도관리

1) 정도관리 주기

새로운 batch의 항결핵제 감수성 검사용 배지 사용시, 항결핵제 감수성 검사용 배지에서 새로운 lot의 항결핵

제나 배지 성분이 사용되었을 때 정도관리를 시행해야 한다. 또한 적어도 일주일에 한번 혹은 검사를 시행할 때마다 항결핵제 감수성 검사에 대한 정도 관리를 실시한다.

일차 및 이차 항결핵제에 모두 다 감수성을 보이는 *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) 또는 *M. tuberculosis* H37Ra (avirulent strain, ATCC 25177) 균주를 이용하며 필요 시 임상 검체에서 분리되거나 외부 정도관리 프로그램의 내성 균주도 이용할 수 있다. 항결핵제에 고도 내성을 보이거나 두 가지 이상의 항결핵제에 내성을 보이는 균주는 검사실 감염 시 큰 문제를 야기할 수 있어 정도관리 균주로 적합하지 않다. 정도관리 균주는 허용범위 내 결과값을 보이고 성장대조는 적절한 성장을 보여야 한다.

배지의 정도관리는 *M. tuberculosis* H37Rv 를 이용하여 기준농도보다 더 낮은 농도의 항결핵제 포함 배지에서 성장 유무를 관찰하여 판정한다. 배지의 무균성을 확인하기 위해 제조 배지를 35-37°C, 5-7% CO₂에서 48시간 동안 배양 후 균의 성장유무를 관찰하여 검사하며 1개 이상의 배지에서 오염이 관찰되면 동일 lot의 배지를 모두 폐기한다.

2) BACTEC MGIT 960 감수성 시험

새로운 lot의 배지를 사용할 때 *M. tuberculosis* ATCC 27294를 이용하여 정도 관리를 실시하며 적어도 일주일에 한번은 정도관리를 시행한다. 배양 4-13일 사이에 성장대조에서 적절한 균성장이 관찰되고 감수성 검사 결과는 모든 시험약제에 감수성이어야 한다. 만약 부적절한 결과가 나오면 재검한다.

7. 결과 및 해석

1) 고체배지를 이용한 항결핵제 감수성 검사

검사 시 대조 배지 및 각 약제 포함 배지에서의 결핵균의 증식 정도는 다음 표 4를 참조하여 판독하며 각각의 결과에 대한 해석은 아래와 같다.

표 4. 배양판정기준

증식 정도	결과보고
>500 colonies (confluent growth)	4+
200-500 colonies (almost confluent growth)	3+
100-200 colonies	2+
50-100 colonies	1+
<50 colonies	실제 집락수 기록

2) 절대농도법

일반적으로 약제 포함 배지에서 20개 이상의 집락이 자란 경우 내성으로 판정한다. 대조 배지에서 집락의 수가 불충분 한 경우 약제배지에서 유의한 증식이 있으면 내성으로 보고 가능하나 약제배지에서 증식이 없다고 감수성으로 보고해서는 안 되며 재검하여 감수성 여부를 다시 확인한다.

3) 내성비율법

- 최소 2개 이상 희석 배율이 다른 균액을 접종하여 대조배지의 집락수와 약제 포함 배지에서 자란 집락수의 비율로 내성 여부를 결정한다. 대조배지에서 최소 1+ 이상 증식이 있고 약제 포함 배지에서 증식이 없는 경우 감수성으로 판정하며 약제 포함 배지에서 내성비율이 1% 이상인 경우 내성으로 판정한다.
- 내성비율을 계산할 때는 여러 희석 배율 중에서 집락수를 셀 수 있는 농도를 선택한다.
- 내성비율(%)=(약제를 포함한 배지에서 자란 집락의 수)/(대조배지에서 자란 집락의 수)×100
- 같은 희석 배수의 균액을 접종한 대조배지와 약제배지에서 집락수를 셀 수 없는 경우에는 다른 희석 배수 균액 접종에서 자란 균수를 이용하되 희석배수를 곱하여 계산한다. 예를 들어, 약제배지에서는 10^{-2} 농도의 균액 접종결과를 이용하고 대조배지에서는 10^{-4} 희석 농도의 균액 접종결과를 이용하는 경우 대조배지의 집락수에 100배의 희석배수를 곱하여 계산한다.
- 약제배지에서 미세 집락이 자라는 것은 내성 혹은 부분내성 균주 증식이나 항결핵제 변성으로 인한 감수성 균주의 과증식의 가능성이 있다. 따라서 미세 집락이 관찰되는 경우 결과판정에 주의해야 한다.
- 대조배지에서 균증식이 없거나 불충분할 경우 한천배지의 경우 3주, LJ 배지의 경우 2주 배양을 연장한다. 연장배양 후 판정 시에는 배지 내 항결핵제 농도가 낮아져 감수성 균주도 증식할 수 있으므로 감수성 결과만을 보고한다.

4) BACTEC MGIT 960 감수성 시험

항균제가 포함된 배지와 포함되지 않은 배지의 성장지수(growth index)값을 비교하여 내성비율을 판독하며 1% 이상 내성균을 검출할 수 있다. 약제배지에서 측정된 형광이 대조배지보다 작으면 감수성으로, 대조배지와 같거나 높으면 내성으로 판정하며 검사 결과에 영향을 주는 원인에 의해서 판독이 불가능할 때 오류로 판정한다.

8. 결과보고 및 검사의 한계와 주의점

- 결과 보고 시에는 검사 방법 및 항결핵제의 종류와 농도를 기재하며 각각의 항결핵제에 대한 감수성, 내성을 보고한다.

- 결핵균은 다른 세균들에 비하여 증식 속도가 매우 느린 특성이 있으며 인체 내에서 다양한 증식형태를 보여 감수성 검사 결과를 적용하는데 어려울 수 있다. 또한 실제 환자의 병변에 있는 균주 분포를 정확하게 반영하지 않을 수 있기 때문에 전적으로 의존해서는 안 된다. Ethambutol과 같은 약제는 감수성 균주와 내성 균주간에 MIC 차이가 크지 않아 감수성 검사의 변별력이 높지 않고 몇몇 이차 항결핵제는 유효혈중 농도와 MIC가 비슷하여 감수성 검사 결과와 임상 반응이 잘 일치하지 않는다.
- 결핵균의 약제 내성은 내재되어 있는 소수의 내성 돌연변이가 약제에 노출되어 선택 증식되어 발생한다. 따라서 약제배지에 과도하게 접종되면 감수성 균주가 내성으로 잘못 판정될 수 있으므로 접종하는 균액의 표준화가 중요하다.
- 비결핵항산균은 보통 항결핵제에 내성이므로 항결핵제 감수성 시험에서 다제내성결핵 혹은 광역내성결핵으로 오인될 가능성이 있으며 항결핵제 감수성 시험 결과가 신뢰성이 없다. 따라서 감수성 검사에서 비결핵항산균이 증식하면 판정불가로 보고한다.
- 전통적인 방법에 의한 약제 감수성검사가 아직까지 표준법으로 쓰이고 있지만, 검사결과를 알기 위해서는 결핵균 배양부터 1개월 이상 소요되는 단점이 있다. 다제내성 또는 광역내성 결핵이 의심되는 경우나 재치료 환자의 경우에는 신속내성검사와 병용하여 시행하는 것이 권고된다.
- BACTEC MGIT 960 감수성 시험에서는 균주의 감수성과 내성 유무만 알 수 있으며 내성 정도를 알 수는 없다. 또한 위감수성의 가능성을 피하기 위해서 isoniazid, rifampin, ethambutol, streptomycin의 기준농도가 일반적인 내성비율법의 기준농도보다 낮게 설정되어 있다.

참고문헌

1. 결핵진료지침. 결핵 진료지침 개발위원회, 질병관리본부, 2011.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard-Second Edition M24-A2. Wayne, PA: CLSI. 2011.
3. Della-Latta P. Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. In: Garcia LS, and Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed, Washington DC.: ASM press, 2010:7.0.1-7.8.8.3.
4. Canetti G. et al. Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ 1963;29:565-78.
5. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. World Health Organization, Geneva, 2008.

2. 검사절차

1. LJ배지 절대농도법(결핵연구원 M-kit)

1) 검사원리

M-kit는 결핵연구원에서 개발한 항결핵제 감수성 검사 배지로 절대농도법을 이용하여 14종의 결핵약제에 대한 감수성을 검사할 수 있다. 국내 다수의 검사실에서 M-kit 혹은 절대농도법을 사용하고 있는데 여러 약제의 내성을 쉽고 간편하게 검출할 수 있기 때문이다. 절대농도법은 여러 농도의 항균제 배지를 준비하여 최소억제 농도를 측정할 수 있다. 그러나 일반적으로 세계보건기구에서 권고하는 기준농도에서만 시험을 하여 항결핵제 감수성을 판정한다. 따라서 접종량에 따라 결과가 크게 영향을 받을 수 있으므로 균액제조에 주의를 해야 한다.

2) 장비와 기구

- McCartney 병 혹은 나사마개 튜브(16×125 mm)
- 직경 3 mm 유리구슬(20-30개)
- 직경 3 mm 루프(22 gauge wire)
- 나사마개 튜브
- Serological pipette (1 mL, 10 mL)
- Step-pipette
- 배양기(incubator)
- 보텍스교반기(vortex mixer)

3) 시약과 재료

- M-kit (그림 1. 참조)
- 10% Tween 80
- Phosphate buffer saline (PBS) 혹은 생리식염수

Control	INH 0.1	INH 0.2	RFP 10	RFP 40	SM 4	EMB 2
Control	INH 1.0	INH 0.2	RFP 20	RFP 40	SM 10	EMB 2
	KM 40	CPM 40	PTH 40	CS 30		RBT 20
PAS 1	OFX 2	MOX 2	AMK 40	LEV 2	PNB 500	RBT 40

그림 1. M-Kit 감수성배지 약제배치와 농도($\mu\text{g/mL}$) (2011년 11월 현재). INH: isoniazid; RFP: rifampicin; SM: streptomycin; EMB: ethambutol; KM: kanamycin; CPM: capreomycin; AMK: amikacin; PTH: prothionamide; CS: cycloserine; PAS: para-aminosalicylic acid; OFX: ofloxacin; MOX: moxifloxacin; LEV: levofloxacin; RBT: rifabutin; PNB: para-nitrobenzoic acid.

4) 검체

- 고체배지에 배양된지 15일 이내의 신선한 결핵균으로 검사한다.
- 일차배양(primary culture)을 이용하는 것이 권장되며 계대배양 균주도 가능하다.
- 충분한 균 증식이 없는 경우(< 10 colonies) 감수성 검사를 시행해서는 안 된다.
- 비결핵항산균으로 항결핵제 감수성 검사를 시행할 수 없다.

5) 검사방법

(1) 균액제조

- ① 유리구슬이 든 McCartney 병에 10% Tween 80 50 μL 를 첨가한다.
- ② 루프로 배지사면에서 가능한 여러 집락을 선택하여 균을 떼어 낸다.
 - 배지를 긁지 않도록 주의한다(균액농도에 영향을 줄 수 있다).
 - 한번에 충분한 균을 얻지 못하면 2-3회 반복하여 적당량을 취한다.
- ③ 유리구슬 위에 균을 루프로 조심스럽게 분산시켜 옮긴다.
- ④ 마개를 막은 후 보텍스교반기로 20-30초간 진탕하여 균덩어리를 분쇄한다.
 - 유리구슬이 든 병을 좌우로 돌려가며 혼합하며, 균덩어리가 병목 쪽에 붙었을 경우 구슬이 든 병을 더욱 눌러 혼합한다.
 - 병에 붙어있는 균이 보이지 않을 때까지 시행한다.
- ⑤ 보텍스교반기로 진탕 후 실온에서 10분간 방치한다.

(2) 균액희석

- ① 멸균된 PBS를 McCartney 병에 넣어 McFarland No.1로 균액농도를 조정한다.
 - PBS를 넣을 때 피펫의 끝이 병에 닿지 않도록 넣어야 한다.
 - PBS를 구슬이 든 병에 가득 채워서 안 된다.
- ② 균액을 20분간 정제 시킨다.
- ③ 나사마개 튜브에 PBS 4.5 mL을 넣고 균액을 0.5 mL 첨가하여 1:10배로 희석한다.

(3) 접종과 배양

- ① M-kit는 사용 전에 실온에 두고 미리 응결수를 제거한다.
- ② 균액을 보텍스교반기로 잠시 진탕 시킨 후 step-syringe (1.5 mL)를 사용 각 약제가 들어있는 배지에 25 μ L 씩 접종한다.
 - Syringe 끝이 손이나 기타 다른 곳에 묻지 않도록 조심하며 오염되었을 경우 즉시 교체한다.
 - 순서를 정하고 신속하게 접종을 한다.
 - 대조배지부터 접종하며 배지 가운데 부분에 접종해야 고르고 쉽게 잘 퍼진다.
- ③ 균액이 고르게 퍼지도록 M-kit를 교반시킨 후 옆면을 종이테이프로 감아준다.

6) 판정과 보고

- 접종한 M-kit는 35-37°C에서 4주간 배양 후 판정하며 판정 기준은 표 4와 같다.
- 판정은 2인이 시행하며 교차 판독하고 대조배지와 각 약제별 증식여부를 검사대장에 기록한다.
- 대조배지와 비교하여 약제배지에서 충분한 증식을 보인 경우를 내성으로 판정한다.
 - 약제배지의 집락수 20개 이상 혹은 대조배지에 비해 1% 이상 증식
- 반드시 대조배지와 약제배지의 증식정도를 비교하여 판정한다.
- 대조배지에서 1+ 이하일 때 또는 대조배지 상에 4+ 이상이면서 약제포함배지에서 불규칙한 균발육을 보일 때는 재검사를 실시해야 한다.
- 대조배지의 집락수가 적더라도 약제배지에서 유의한 증식이 있으면 내성으로 보고할 수 있다.
 - 약제배지에서 증식이 없으면 재검을 하여 감수성 여부를 다시 확인한다.
- PNB 배지에서 증식이 있는 경우 비결핵항산균 혹은 비결핵항산균/결핵균 혼합배양을 의미하므로 감수성 결과를 보고해서는 안 된다.
 - 비결핵항산균은 보통 항결핵제에 내성이므로 다제내성결핵 혹은 광역내성결핵으로 오인될 가능성이 있으며 항결핵제 감수성 검사 결과의 신뢰성이 없다.

2. LJ배지 내성비율법

1) 검사 원리

내성비율법은 Dr. Canetti 등에 의해 개발이 되었고 WHO에 의해 표준검사법 중 하나로 인정받고 있다. 내성비율법에 의한 결핵균의 내성검출은 다른 세균의 내성 검사에 이용되는 개념과는 다르다. 내성비율법은 균 주 중에 내성인 결핵균의 비율을 측정하는데 특정 비율 이하인 균주는 감수성으로 판단하고 특정 비율 이상인 경우를 내성으로 분류한다. 이 방법에서는 각 약제별로 기준농도(critical concentration)의 배지에서 기준비율(critical proportion) 이상으로 증식하는 것을 내성으로 판단한다. 현재 내성비율법은 전세계적으로 가장 널리 사용되는 항결핵제 감수성 검사 방법이며 감수성 시험의 기준이 되는 검사법이다. LJ 배지를 이용한 내성비율법은 많은 국가의 참조검사실에서 이용되고 있다.

2) 장비와 기구

- McCartney 병 혹은 나사마개 튜브(16×125 mm)
- 직경 3 mm 유리구슬(20-30개)
- 피펫(0.1, 0.2, 1.0 mL)
- 피펫 보조기구(pipette aid)
- 직경 3 mm 루프(22 gauge wire)
- 보텍스교반기(vortex mixer)

3) 시약과 재료

- PBS 혹은 생리식염수
- McFarland standard No. 1.
- 약제 포함 배지
- LJ 사면배지

4) 검사방법

내성비율법은 기준농도의 항결핵제를 포함하는 배지와 대조배지간의 결핵균의 증식의 비율을 검출하는 방법이다. 기준농도는 표 1에 기술되어 있으며 기준비율은 일반적으로 1%를 적용한다.

(1) 균액제조

- McFarland No. 1 농도의 균액을 제조한다.
- M-kit 검사법의 균액제조방법을 참조한다.

(2) 균액희석

McFarland No.1 농도로 준비된 균액을 10배씩 단계적으로 희석하여 10^{-4} 혹은 10^{-5} 농도의 균액을 제조한다. 10^{-4} 균액은 $10\mu\text{L}$ 루프로 검사 시 사용되고 10^{-5} 희석균액은 마이크로피펫을 사용할 때 이용한다.

※ 주의: 직경이 3 mm인 루프를 이용하면 $10\mu\text{L}$ 를 접종할 수 있다. 이와 같이 calibration이 된 루프를 이용할 경우 1 mL의 증류수에 한 루프의 균액을 첨가하면 10^{-2} 희석용액을 쉽게 제조할 수 있다. 이와 같은 방법으로 10^{-4} 도 쉽게 제조가 가능하다.

(3) 접종

- ① 모든 배양병 set에 환자의 ID를 표기한다.
- ② 접종하기 전에 배지에 있는 응결수를 제거한다.
- ③ 마이크로피펫으로 $100\mu\text{L}$ 를 접종하거나 보정된 루프로 $10\mu\text{L}$ 를 접종할 수 있다.
- ④ $100\mu\text{L}$ 접종 시에는 10^{-3} 과 10^{-5} 균액을 이용하고 $10\mu\text{L}$ 를 접종할 경우 10^{-2} 와 10^{-4} 균액을 이용한다.
- ⑤ 균액은 접종량에 맞게 조정이 되어 있어야 하며 항결핵제가 없는 대조배지에서 30-100개 집락을 형성할 정도가 가장 좋다.
- ⑥ 접종을 할 때는 배지 사면에 고르게 해야 하며 적어도 사면의 80% 하단부에 접종하려고 노력해야 한다.

(4) 배양

- ① 배양온도는 $35-37^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 접종 배지는 배양 1주일 후부터 관찰한다.
- ② 감수성 판정은 4주 배양 후에 시행한다.
- ③ 일부 균주(특히 내성 결핵균)는 증식이 아주 느려서 2주의 추가 배양이 필요하다.
- ④ 총 6주간 배양을 하여도 대조배지에서 증식이 없으면 결과해석을 할 수 없다.

5) 판정 및 보고

배양 4주에 1차 판정을 하여 결과를 보고하며 최종 판정은 6주에 해야 한다. 1% 희석액의 대조 배지 증식이 30-100 집락이 되는 것이 이상적이다. 만약 대조배지에서 20개 이하의 집락이 자란 경우 내성판정만이 가능한데 집락수가 적으면 1% 판정이 어렵기 때문이다. 대조배지 증식이 불충분하고 약제배지에서 균증식이 없는 경

우 감수성으로 판정해서는 안되며 재검하여 감수성 여부를 다시 확인한다.

1%를 내성판정의 기준으로 하며 1% 이상 자란 경우 내성, 그 이하이면 감수성으로 판단한다. 간혹 내성균의 비율이 1%에 가까운 경우가 있는데 이를 경계결과(borderline result)라고 하며 재검을 통해 다시 결과를 확인한다.

3. 한천배지 내성비율법

1) 검사원리

한천배지 내성비율법은 표준화된 균액을 여러 단계로 희석하여 항결핵제를 포함하는 한천배지와 포함하지 않는 한천배지에 동량 접종하여 결과를 얻는다. 대조배양에서는 집락의 수가 셀 수 있을 정도로 충분히 성장해야 하며 항결핵제 포함 배지에서 증식된 집락수와 비교하여 내성균의 비율을 구한다. 약제배지에서 대조배지보다 1% 이상 증식한 경우 내성으로 판단한다. 한천배지를 사용할 경우 LJ 배지를 사용할 때보다 batch 간의 차이가 적고, 항균제 활성의 손실이 거의 없는 장점이 있다.

2) 장비와 기구

- 멸균된 사분 페트리 플레이트(15×100 mm) (Quadrant Petri plate)
- McCartney 병 혹은 나사마개 튜브(16×125 mm)
- 직경 3 mm 유리구슬(6-10개)
- 직경 3 mm 루프(22 gauge wire)
- Serological pipette (1 mL, 10 mL)
- 보텍스교반기(vortex mixer)
- CO₂ 투과성폴리에틸렌 백
- 핫플레이트(hot plate)
- 온수조(50-56°C)
- CO₂ 배양기
- 실체현미경(Stereoscopic microscope) (30배 혹은 60배)

3) 시약과 재료

- 한천배지

Middlebrook 7H10 (7H10) 한천배지가 감수성 시험을 위해서 권장된다. Middlebrook 7H11 (7H11) 배지를

사용할 경우 기준농도에 차이가 있어 주의해야 한다. 7H11 배지는 isoniazid 내성 균주의 검사에 도움이 될 수 있다.

[7H10배지 제조 방법]

- ① 7H10 한천 파우더를 제조사의 지침에 따라 멸균된 증류수에 첨가한다.
- ② 자기교반기(magnetic stirrer)와 핫플레이트를 이용하여 투명해질 때까지 녹인다.
- ③ 0.5%의 농도가 되도록 glycerol을 첨가하고 3-5분간 잘 섞는다.
- ④ 플라스크의 입구를 막고 autoclave에서 고압멸균한다.
- ⑤ 멸균 후 온수조에서 50-56°C의 온도로 식힌다.
- ⑥ Oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC)를 10%가 되도록 첨가한다.
- ⑦ 적절한 항균제를 첨가한 후 실온에서 응고시킨다.
- ⑧ 제조된 배지는 햇빛이 차단된 밀폐용기에 넣어 냉장보관한다.

항균제를 배지에 첨가하는 방법은 크게 두 가지로 정량의 항결핵제를 포함하는 디스크를 이용하여 용출시키는 방법과 약제 용액을 이용하는 방법이 있다.

(1) 항균제 디스크 용출방법

특정량의 항결핵제를 포함하고 있는 디스크를 100 mm 배지 플레이트의 한 사분면에 넣고 배지를 부어서 만드는 방법이다. 상품화된 디스크를 이용하므로 표준화가 쉽고 제조가 간편하다. 디스크에 포함된 항균제량과 최종농도는 다음의 표 5와 같다.

표 5. 7H10 한천배지와 항균제 디스크를 이용한 감수성배지 제조

Drug	Amount (μ g) per Disk	Final drug concentration (μ g/mL)
Isoniazid	1	0.2
	5	1.0
Rifampicin	5	1.0
	25	5.0
Ethambutol	25	5.0
	50	10.0
Streptomycin	10	2.0
	50	10.0

- ① 멸균된 플레이트 각 사분면에 필요한 항균제 디스크를 무균적으로 놓는다.

- ② OADC가 첨가된 7H10 한천배지를 준비한다
- ③ 각 사분면에 배지 5 mL를 디스크가 잠기도록 부어 준다.
- ④ 실온에서 배지가 응고될 때까지 기다린다.
- ⑤ 배지의 물기는 laminar flow를 이용하여 건조시킬 수 있으나 너무 과하게 건조시키면 약제농도에 영향을 줄 수 있어 주의해야 한다.
- ⑥ 감수성 배지는 햇빛을 피해 비닐백에 밀봉하여 4-8°C에서 2주간 냉장보관할 수 있다.
- ⑦ 배지의 무균성을 확인하기 위해 각 배치마다 샘플을 골라 35-37°C에서 48시간 배양한다.

(2) 액상의 항균제를 이용한 배지제조

- ① Stock tube를 녹여서 필요한 농도로 희석한다.
- ② 농도를 맞추기 위해 정확한 용량을 사용한다.
- ③ 200 mL의 배지를 제조할 경우 180 mL의 7H10 배지를 준비하여 50-56°C로 온도를 유지한 상태에서 약제를 첨가하고 잘 섞는다.
- ④ 잘 혼합된 배지에 20 mL의 OADC를 넣어서 200 mL로 맞추고 다시 잘 섞어준다.
- ⑤ 멸균된 플레이트의 사분면에 5 mL씩 분주한다.
- ⑥ 첨가물을 다 혼합한 후 빨리 분주를 하는 것이 좋으며 공기방울의 생성을 주의한다.
- ⑦ 실온에서 배지가 응고될 때까지 기다린다.
- ⑧ 배지의 물기는 laminar flow를 이용하여 건조시킬 수 있으나 너무 과하게 건조시키면 약제농도에 영향을 줄 수 있어 주의해야 한다.
- ⑨ 건조 후에는 즉시 사용하거나 비닐백에 밀봉하여 냉장보관한다.
- ⑩ 배지의 무균성을 확인하기 위해 각 배치마다 샘플을 골라 35°C에서 48시간 배양한다.

4) 검사방법

(1) 균액제조

- ① McFarland No. 1 균액을 제조한다.
- ② M-kit 균액제조 방법 참조

(2) 접종 및 배양

- ① 배지 플레이트에 환자의 ID를 표기한다.
- ② 준비된 표준균액을 10^{-2} 와 10^{-4} 농도로 희석한다.

- ③ 마이크로피펫을 이용하여 10^{-2} 균액 100 μ L을 대조배지와 약제배지에 각각 접종한다.
- ④ 10^{-4} 희석균액도 마찬가지로 대조배지와 약제배지에 각각 접종한다.
- ⑤ 시험하는 균주가 배양된지 오래되었거나 집락이 적을 경우는 희석 배수를 1:10 혹은 1:1,000으로 낮출 수 있으며, 계대배양을 하여 충분한 균주로 시험할 수도 있다.
- ⑥ 접종 후에는 배지면을 아래로 하여 균액이 흡수될 수 있도록 실온에 둔다.
- ⑦ CO₂ 투과성 폴리에틸렌 백(permeable polyethylene bag)에 넣어 35-37°C와 5-10% CO₂ 대기 조건에서 배지면을 위로 하여 배양한다.
- ⑧ Formaldehyde 가스생성을 예방하기 위해서 감수성배지는 햇빛에 노출되어서는 안 된다.
- ⑨ 3주간 배양하며 실체현미경으로 매주 증식을 관찰한다. 첫 주 판정은 오염을 검출하는 것이 목적이다.
- ⑩ 대조배지에 50개 이상의 집락이 관찰되고 증식이 좋을 경우 내성은 3주 이전에도 판독이 가능하다. 그러나 감수성 결과는 3주간 배양한 후에 보고해야 한다.

4. 판정 및 보고

1) 한천배지의 증식결과 보고

대조배지와 약제배지 증식결과를 배양판정표에 따라 기록한다.

2) 내성비율계산

- 대조배지 2개 중에서 적어도 하나에서 50개 이상의 집락이 관찰되어야 하는데 그렇지 않으며 정확한 판정을 할 수 없다.
- 10^{-4} 희석 균액을 접종한 대조배지에서 50개 이상의 집락이 자라지 않는 경우 10^{-2} 농도의 균액 접종결과를 대조로 이용할 수 있다. 이 때는 대조배지의 집락수에 100배의 희석배수를 곱하여 계산하여야 한다.
- 대조배지에서 3+ 혹은 4+의 증식을 보이고 약제 배지에서 증식이 없는 경우 감수성으로 보고한다.
- 대조배지에서 4+이고 약제배지에서 그 보다 낮은 증식을 보인 경우 내성비율을 정확히 계산할 수 없어 재검해야 한다.
- 대부분의 경우 결과해석이 어렵지 않으나 내성비율이 1%에 근접한 경우에는 판정이 애매할 수 있다.
- 미세집락이 관찰되는 경우는 내성균주의 증식, 부분내성 혹은 감수성균주의 과증식으로 인한 오류의 가능성이 있다. 미세집락의 중요성은 아직 규명되지 않았으므로 각 검사실은 이에 대한 보고방법을 만들어야 한다.

[내성비율 계산법]

$$\text{내성비율(\%)} = (\text{약제를 포함한 배지에서 자란 집락의 수}) / (\text{대조배지에서 자란 집락의 수}) \times 100$$

5. MGIT 960 감수성 시험

1) 검사 원리

MGIT 감수성 시험법은 내성비율법과 비슷한 원리를 이용하며 1% 이상의 내성균을 검출할 수 있다. BACTEC MGIT 960 시스템은 센서를 통해 증가된 형광의 양을 자동적으로 측정하여 이 값을 Growth Value (GV)로 보여 준다. 만약 배지에 결핵균의 성장을 억제(Bacteriostatic)하거나 사멸(Bactericidal)시키는 항균제가 첨가 된다면, 균의 성장을 억제 하여 산소의 소비량이 적어지거나 전혀 없으므로 형광 센서의 변화가 없게 된다. 현재 MGIT 960 시스템으로는 일차 항결핵제에 대한 감수성 검사만 가능하다.

2) 기구와 장비

- BACTEC MGIT 960
- 마이크로피펫
- AST set carrier
- 보텍스교반기(vortex mixer)

3) 시약과 재료

- BACTEC MGIT 960 SIRE kit
 - 동결건조된 streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol 각각 1병과 SIRE supplement 8병으로 구성됨.
- SIRE supplement는 배양용 MGIT Growth Supplement와는 다르며 조성은 아래와 같다.
 - Bovine albumin ----- 50.0 g/L
 - Dextrose ----- 20.0 g/L
 - Catalase ----- 0.03 g/L
 - Oleic acid ----- 0.6 g/L
- BACTEC MGIT 960 STR 4.0 kit (고농도 streptomycin 검사용)
- BACTEC MGIT 960 INH 0.4 kit (고농도 isoniazid 검사용)

- MGIT 튜브
- 멸균 증류수
- 멸균 식염수

4) 검체

- 결핵배양 양성 MGIT 튜브
- 고체배지에서 순배양된 결핵균

5) 검사방법

(1) 약제 제조

[SIRE 항결핵제]

- 각 항균제 병에 멸균 증류수를 4 mL 첨가하여 약제를 용해시킨다.
- 제조 후 약제농도는 아래 표와 같다.

약제	약제농도($\mu\text{g/mL}$)	첨가용량(μL)	최종농도($\mu\text{g/mL}$)
MGIT STR	83	100	1.0
MGIT INH	8.3	100	0.1
MGIT RIF	83	100	1.0
MGIT EMB	415	100	5.0

[고농도 streptomycin, isoniazid]

- 항균제 병에 멸균 증류수를 2 mL 첨가하여 약제를 용해시킨다.
- 제조 후 약제 농도는 아래 표와 같다.

약제	약제농도($\mu\text{g/mL}$)	첨가용량(μL)	최종농도($\mu\text{g/mL}$)
MGIT STR 4.0	332	100	4.0
MGIT INH 0.4	33.2	100	0.4

[보관]

동결 건조된 항균제는 2-8°C에 냉장 보관 하고, 사용 전 용해하여 사용한다. 개봉 후 남은 항균제는 용해된 상태로 소분하여 -20°C 이하에서 최고 6개월 또는 유효일자까지 보관 가능하다. 일단 녹여 사용한 후, 남은 양은 폐기 하고 다시 냉동하지 않는다.

(2) 접종액 준비

[MGIT에서 배양된 경우]

- ① 장비에서 MGIT 튜브가 양성으로 판독된 당일을 Day 0로 시작한다.
- ② 감수성 검사 전에 튜브는 최소 1일 더 배양되어야 한다(일반 배양기를 이용하여 35-37°C 에서 배양할 수 있다).
- ③ 배양양성 MGIT 튜브는 판정 이후로 5일까지 감수성 검사가 가능하다. 양성 판정 후 5일이 지난 튜브는 새 MGIT 튜브에 MGIT 960 Growth Supplement를 첨가하여 계대배양 해야 하며, 장비에서 양성으로 판독 될 때까지 배양하여 검사한다.
- ④ 양성 판정 이후 1-2일된 튜브는 보텍스교반기로 균덩어리를 잘 풀어 5-10분간 방치 한 후 상층액을 사용한다.
- ⑤ 양성 판정 이후 3-5일된 튜브는 보텍스교반기로 균덩어리를 잘 풀어 5-10분간 방치 한 후 상층액 1 mL를 멸균된 식염수 4 mL와 희석하여 사용한다.

[고체배지 검체 준비]

- ① 배양양성이 확인된 지 15일 이내의 신선한 균주를 사용한다.
- ② 균액제조 방법은 M-kit에 기술된 방법을 참고한다.
- ③ 균액에 식염수를 첨가하여 탁도를 McFarland No. 0.5로 조정한다.
- ④ 1 mL의 균액을 4 mL 식염수에 첨가하여 1:5 비율로 희석한 후 잘 섞어 사용한다.

(3) 접종과 배양

[항균제 및 Supplement 첨가]

- ① 5개의 MGIT 튜브에 각각 GC (Growth Control), STR, INH, RIF, EMB로 표기한다.
- ② 약제명이 표기된 MGIT 튜브에 무균상태로 BACTEC 960 SIRE Supplement 0.8 mL씩 첨가한다(이때 배양 용 MGIT Growth Supplement가 아닌 MGIT SIRE Supplement 사용하는 것에 주의한다).
- ③ 각 항균제명이 표시된 튜브에 미리 용해한 항균제 0.1 mL을 무균적으로 첨가한다. 항균제의 종류에 따라 각각 다른 팁을 사용하며, GC튜브에는 항균제를 첨가하지 않는다.

[균액 접종]

- ① 준비된 균액을 항균제가 첨가된 MGIT 튜브에 0.5 mL 접종한다.
- ② 균액 0.1 mL을 식염수 10 mL에 첨가하여 1:100으로 희석하고, 5-6회 뒤집어 섞은 후 0.5 mL을 GC 튜브

에 접종한다.

- ③ 접종 후 마개를 단단히 막고 3~4회 뒤집어 잘 섞어 준다.
- ④ 일반적인 기준농도로 시험할 경우 SIRE검사는 5개의 튜브 세트(5-set carriers)를 사용하며, 각 약제 이름이 표기된 튜브의 배열순서는 GC, STR, INH, RIF, EMB으로 한다.
- ⑤ BACTEC MGIT 960 System에 넣어 감수성 검사를 진행한다(BACTEC MGIT 960 사용자 설명서, AST 절차 참조). AST Set Carrier 순서가 정의된 순서와 동일한지 확인한다.
- ⑥ 순수배양 여부를 확인을 위해 배양액을 혈액한천배지나 Chocolate 한천에 접종하여 35-37°C에서 48시간 배양하여 균이 자라지 않으면 검사를 진행하고 균이 자라면 감수성 검사를 폐기한다.

(4) 고농도(higher drug concentration) 약제 검사

항결핵제 감수성 검사는 표준화된 기준농도에서 시행하는 것이 권장된다. 그러나 경우에 따라 기준농도보다 높은 농도에서 감수성검사를 시행할 수 있다. 이는 일부 결핵균이 특정 약제에 대한 내성정도가 낮아 기준농도에서 내성이지만, 고농도에서는 감수성이기 때문이다. SIRE 중 streptomycin, isoniazid와 ethambutol 세 가지 약제에 대해서 고농도 약제(Higher Drug Concentration) 검사를 할 수 있다. 특히, isoniazid의 감수성 결과가 기준농도에서는 내성이나 고농도에서 감수성인 경우, 임상에서는 isoniazid를 치료제로 선택할 수 있어 중요하다. BACTEC MGIT STR 4.0 Kit는 냉동 건조된 streptomycin (664 μ g) 1병과 SIRE Supplement 2병이 들어 있고, BACTEC MGIT INH 0.4 Kit는 냉동 건조된 isoniazid (66.4 μ g) 1병, SIRE Supplement 2병이 들어 있다. BACTEC MGIT EMB 7.5 Kit도 동결건조된 ethambutol (1,245 μ g)과 SIRE Supplement 2병이 들어 있다.

고농도의 약제 감수성 검사 준비는 우선, 동결건조 된 약제에 각각 2.0 mL씩의 멸균 증류수로 녹이고, 0.1 mL을 MGIT 배지에 넣는다.

6) 판정

- MGIT 960 장비는 장착된 검사 세트를 지속적으로 모니터링 한다.
- 배양 4-13일 사이에 검사완료 표시가 나타나면 감수성 검사 세트의 번호를 스캔하고 결과지를 출력한다.
- 감수성 검사 결과는 감수성(S) 내성(R) 오류(X)로 표시된다.
- MGIT 960은 GC의 Growth Unit (GU)이 400에 도달하면 (4-13일 소요) 약제 배지의 GU값과 비교하여 감수성결과를 판정한다.
 - S=Susceptible (감수성): GU값이 100 미만
 - R=Resistant (내성): GU값이 100 이상
 - X=Error (오류): 해석불능

- 오류의 원인으로는 첫째, 대조군의 GU이 검사한 지 4일이 되기 전에 400U 이상에 도달한 것으로, 오염의 가능성이 있으므로 결핵균을 분리하여 재검사해야 한다. 둘째, 증식이 느린 결핵균은 배양 13일까지 음성일 수 있다. 이 경우 권장 접종량으로 13일 내에 결과를 얻을 수 없으므로 접종액의 농도를 기준보다 높여 재검한다.

7) 보고

- 결과보고는 가능한 한 빨리 이뤄져야 하며 검사방법, 약제의 종류와 농도가 기재되어야 한다. 결과가 내성이면 육안으로 배지의 혼탁도를 관찰한다. 배지가 혼탁할 경우 세균오염이나 비결핵항산균의 증식 가능성이 있으므로 한천배지에 배양액을 계대배양하여 오염여부를 확인하거나, 배양된 균주가 비결핵항산균인지 확인한다.
- Rifampicin 단독내성이나 ethambutol 단독내성과 같이 드문 내성양상이 확인되거나 예상한 결과와 다른 경우 재검을 시행해야 한다.

6. Pyrazinamidase 검사(PZase test, Wayne test)

1) 검사원리

Pyrazinamide (PZA)는 산성조건에서 작용하는 항결핵제로 통상적인 약제감수성 검사 방법을 적용할 수 없다. PZA는 전구약제로 결핵균의 pyrazinamidase (PZase)에 의해 ammonia와 활성형인 pyrazinoic acid로 분해되어 살균작용을 나타낸다. PZA 내성결핵균은 PZase 활성이 없어 PZA를 분해하지 못한다. 본 검사는 PZA 분해 효소의 활성을 검사하여 PZA 내성을 확인하는 검사이다.

2) 장비와 기구

- 접종 루프(inoculation loop)
- 배양기
- 마이크로피펫

3) 시약과 재료

(1) 1% ferrous ammonium iron sulfate

- ① Ferrous ammonium sulfate: 10 g (분자식: $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- ② DW: 1,000 mL

③ 4°C에 보관

(2) Agar medium

- ① Dubos broth base: 6.5 g
- ② Bacto agar: 15 g
- ③ Sodium pyruvate: 2 g
- ④ PZA: 100 mg
- ⑤ DW: 1,000 mL
- ⑥ 열을 가하면서 녹인 후 tube에 4 mL씩 분주한다.
- ⑦ 고압멸균 후 사용

4) 검체

고체배지에 순배양된 결핵균(15일 이내)

5) 검사방법

- 결핵균 집락을 취하여 PZA 배지에 5 mg 이상 접종한 다음 37°C에서 5일간 배양한다.
 - 루프를 이용하여 PZase tube 옆면에 균이 묻지 않도록 조심하여 접종한다.
 - 균이 마른 상태면 루프로 약간 눌러 골고루 퍼서 놓고 습윤한 상태의 균은 배지표면에 잘 퍼서 놓는다.
 - 균량이 적을 경우에는 배지표면을 약간 긁어서 넣거나 배양을 연장한다.
- 배양된 배지 위에 1% ferrous ammonium sulfate 용액 1 mL를 첨가한 후 4시간 동안 냉장고에 보관한다.
 - 냉장고에 보관된 1% ferrous ammonium sulfate 용액에 침전물이 부유 되었을 경우에는 침전물이 완전히 가라 앉은 후 사용해야 된다.

6) 결과판정과 보고

- Agar상에 분홍색 선이 보이면 PZase에 의해 PZA가 pyrazinoic acid와 ammonia로 가수분해 되었음을 의미하며 PZA 감수성으로 표기한다.
- 판정 시 분홍색이 불확실할 경우는 재검을 실시한다.
- 오염된 경우에도 PZase 양성으로 보일 수 있으므로 오염여부를 미리 용기에 표기한다.
- *M. bovis*의 경우 PZA에 자연내성이고 일부 비결핵항산균은 PZase를 분비하므로 주의를 요한다(표 6. 참조).

표 6. 항산균 균종별 PZase 활성도

PZase positive	PZase negative
<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i> , BCG
<i>M. marinum</i>	<i>M. kansasii</i>
<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>	<i>M. simae</i>
	<i>M. szulgai</i> , <i>M. gastri</i>

7) 정도관리

양성대조로 *M. avium*이나 *M. intracellulare* 표준균주를 이용하며, 접종하지 않은 배지를 음성대조로 매 검사마다 정도관리를 시행한다.



그림 1. 직경 3 mm 유리구슬이 들어 있는 McCartney 병.



그림 2. 균액접종을 위한 Step pipette.



그림 3. MGIT AST carrier.

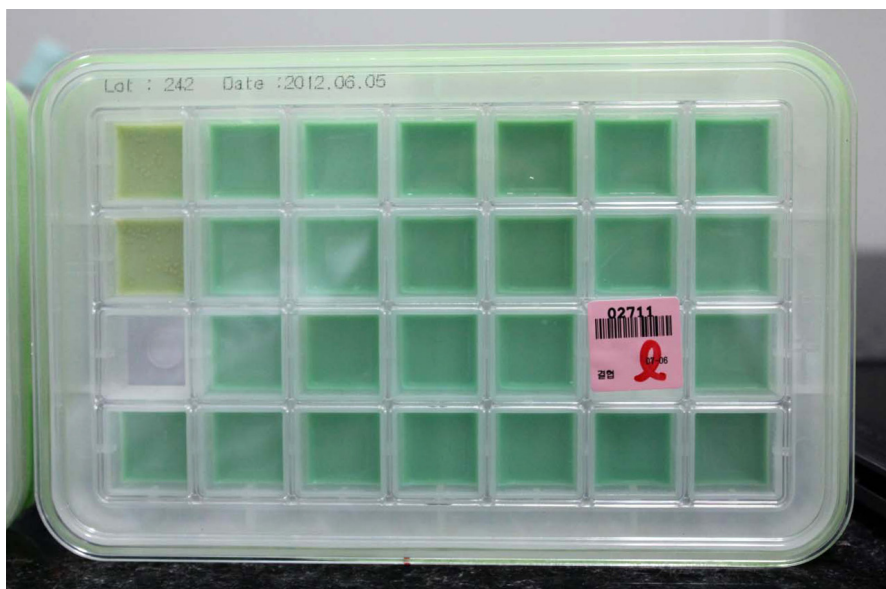


그림 4. M-kit (전약제 감수성결핵).

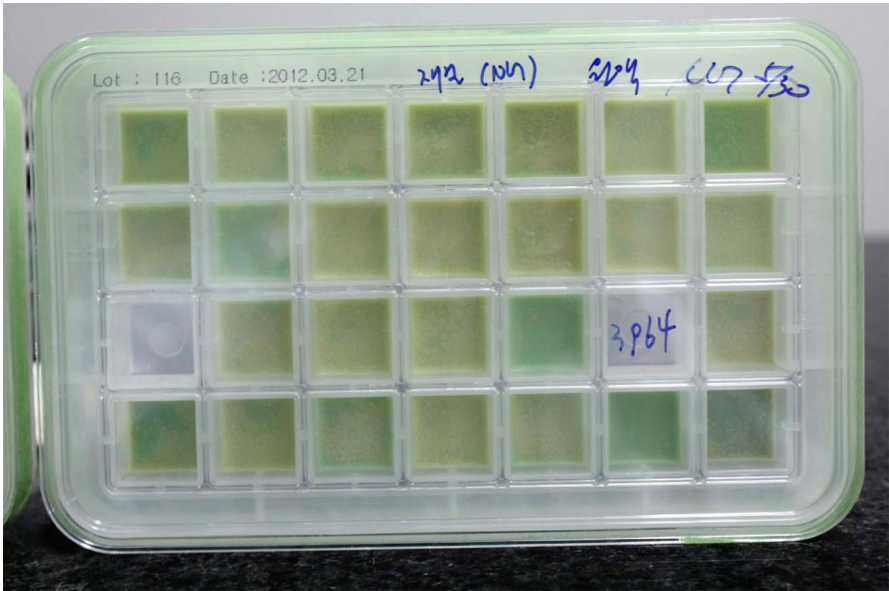


그림 5. M-kit (광역내성결핵 균주).

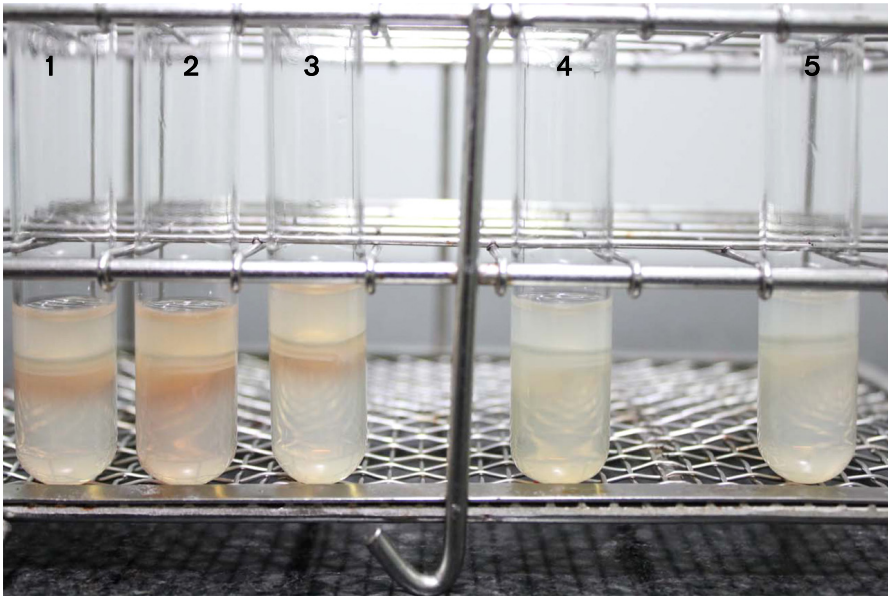
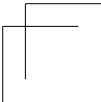
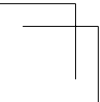
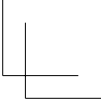
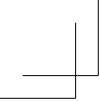


그림 6. Pyrazinamidase test (1, 2, 3: 양성, 4: 음성, 5: 음성대조).

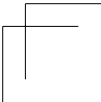
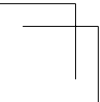
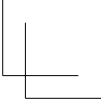
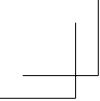


부록

결핵검사지침

1. McFarland 탁도표준(McFarland turbidity standard) 제조	139
1.1. 원리	139
1.2. 시약과 재료	139
1.3. 제조방법	140
1.4. 사용방법	140
1.5. 주의 사항	141
1.6. 정도관리	142





부록

McFarland 탁도표준(McFarland turbidity standard) 제조

1. 원리

McFarland 탁도표준은 육안비교를 통해 균액의 농도를 표준화하는데 사용된다. Barium sulfate 결정을 만들기 위해 barium chloride를 황산용액에 첨가하여 제조한다. 이 두 시약의 비율을 조정하면서 다양한 농도의 탁도표준을 만들 수 있다. 임상미생물검사실에서 가장 흔히 사용하는 농도표준은 0.5이며 1.5×10^8 bacteria/mL의 농도에 해당한다(1.0×10^8 에서 2.0×10^8).

2. 시약과 재료

1) 1% 황산(H_2SO_4)

- ① 증류수 90 mL을 100 mL 용량의 플라스크에 넣는다.
- ② 농축된 황산 1 mL를 플라스크에 넣는다.
- ③ 증류수를 100 mL까지 넣는다.
- ④ 마개가 있는 유리용기에 넣어 보관한다($25^\circ C$ 에서 1년까지).

2) 1.175% Barium chloride ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)

- ① $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.175 g을 재어 100 mL 용량의 플라스크에 넣는다.
- ② 50 mL의 증류수를 플라스크에 넣고 잘 녹인다.
- ③ 증류수를 더 넣어 100 mL를 채운다.
- ④ 마개가 있는 유리용기에 넣어 보관한다($25^\circ C$ 에서 1년까지).

3. 제조방법

1) 아래의 표의 비율에 따라 혼합하여 원하는 농도의 표준을 만든다.

2) McFarland 0.5 제조방법

- ① 1% 황산용액 85 mL를 100 mL 용량의 플라스크에 넣는다.
- ② 1.175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 용액 0.5 mL을 조금씩 황산에 첨가한다(플라스크는 계속 흔들어 준다).
- ③ 1% 황산용액을 더 부어 100 mL를 만든다.
- ④ Magnetic stirring bar를 이용하여 3-5분간 섞어준다.
- ⑤ 육안으로 균질성을 점검하고 결정이 있는지를 확인한다. 흡광도를 측정하고 기록한다.
- ⑥ 정도관리가 적합하면 각각의 튜브에 2-7 mL씩 분주한다(실제 검사에서 균액제조할 때 사용하는 용량에 따라 분주량을 조절).
- ⑦ 마개를 단단히 막고 파라필름으로 밀봉한다.
- ⑧ 제조된 탁도표준은 빛에 노출되지 않게 하여 실온에서 보관한다(최대 12개월).

표 1. McFarland 탁도표준 제조방법과 예상 균농도

Standard No.	Vol (mL)		No. of bacteria/mL (10^8) represented
	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.175%)	H_2SO_4 (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

4. 사용방법

- 1) 검사 전에 이미 만들어진 McFarland 탁도표준액을 잘 섞는다(표 1. McFarland 탁도표준 제조방법과 예상

균농도 참조).

2) 검사할 균액을 잘 섞는다.

3) 조명이 밝은 곳에서 서로 비교한다.

- 두 개의 튜브를 위커햄 카드(Wickerham card) 앞에 둔다(그림 1. 참조).
- 탁도표준을 통해서 볼 때보다 균액을 통해서 볼 때 그림의 선을 보기 힘들 경우 균액의 농도가 너무 높으므로 희석해야 한다.
- 위와 반대의 경우에는 균액의 농도를 높여야 한다.

5. 주의 사항

- 1) 균액제조 시 사용하는 튜브와 탁도표준 튜브의 직경이 같아야 한다.
- 2) 탁도표준은 공기와 접촉할 경우 응집이 생기거나 증발하기 쉽다. 따라서 마개는 파라필름으로 단단히 밀봉되어야 한다.
- 3) 분광광도계(spectrophotometer)가 없는 경우 정도관리를 위해 *E. coli* (ATCC 25922)와 같은 균으로 균액을 제조하여 배양 집락수를 확인하는 방법으로 대체할 수 있다.
 - McFarland 탁도표준에 맞춰 균액을 제조한다.
 - 생리식염수로 연속적으로 10배 희석하여 6단계의 희석균액을 준비한다.
 - 예상 집락수가 30에서 300개인 희석균액 0.1 mL을 혈액천배지에 고르게 접종한다.
 - 집락수가 예상 값의 10% 오차범위 이내에 있어야 한다.
- 4) McFarland 탁도표준에 따라 제조된 균액에 존재하는 생균수는 시험 세균의 크기, 생존력, 응집여부에 크게 영향을 받는다.
- 5) 상품화된 McFarland 탁도표준을 사용할 경우 제조사의 지침을 따른다.
- 6) 표준화된 농도의 균액제조를 위해 상품화된 기구들을 사용할 수 있다.



표 2. McFarland 0.5 농도 적용 시 희석농도별 예상 집락수

희석 배율	예상 집락수(0.1 mL 접종시)
10^{-1}	TNTC
10^{-2}	TNTC
10^{-3}	TNTC
10^{-4}	TNTC
10^{-5}	TNTC
10^{-6}	150
10^{-7}	15

TNTC, too numerous to count

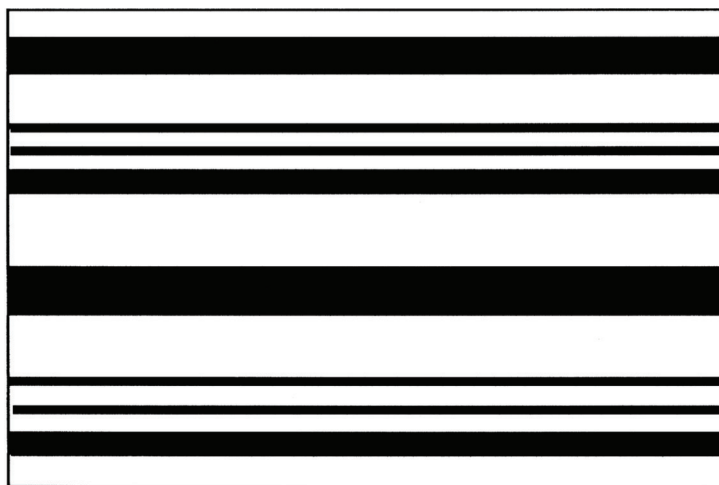


그림 1. 위커햄 카드(Wickerham card).

6. 정도관리

1) 제조단계

- 625 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 기록한다. McFarland 0.5의 허용범위는 0.08에서 0.10이다.
- McFarland 0.5 이외의 표준에 대한 흡광도 허용범위는 자체적으로 설정해야 한다.

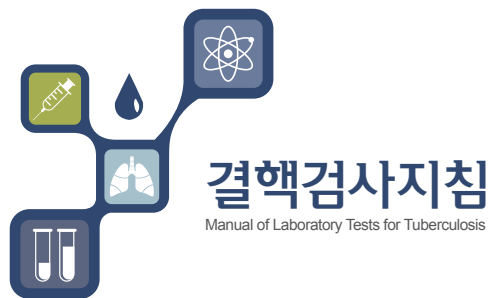
2) 사용시

- 사용시마다 시약을 확인하여 뭍침이 있을 경우 폐기한다
- 제조 직후에 용액의 높이를 표시하여 증발하였는지 확인한다.
- 제조 후 3개월에 흡광도를 점검하고 매월 흡광도를 재측정하여 최대 1년까지 사용할 수 있다.



결핵검사지침

발행일	2013년 6월 28일
발행인	조명찬, 신종희
편집위원장	신종희
편집 및 집필위원	김미나, 김수현, 김창기, 김한성, 노경호, 박경운 박연준, 배혜경, 신희봉, 이종윤, 이혁민, 장철훈
발행처 및 문의처	질병관리본부 국립보건연구원



질병관리본부



국립보건연구원
Korea National Institute of Health



대한임상미생물학회
The Korean Society of Clinical Microbiology