



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2009年度 8月
碩士學位論文

오염된 결핵균 검체에서 PCR 과
GenoType MTBDRplus 를 이용한
신속 결핵균체 검사법

朝鮮大學校 大學院

生命工學科

許 煉

오염된 결핵균 검체에서 PCR 과
GenoType MTBDRplus 를 이용한
신속 결핵균체 검사법

Study on the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*

Using by PCR and GenoType MTBDRplus in Contaminated Specimen

2009年 8 月 25 日

朝鮮大學校 大學院

生命工學科

許 煉

오염된 결핵균 검체에서 PCR 과
GenoType MTBDRplus 를 이용한
신속 결핵균체 검사법

指導教授 梁 永 基

이 論文을 理學碩士 學位 申請 論文으로 제출함

2009年 4 月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

生 命 工 學 科

許 煉

許 煉 碩士學位論文을 認准함.

委員長 朝鮮大學校 教授 印

委 員 朝鮮大學校 教授 印

委 員 朝鮮大學校 教授 印

2009年 5月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

LIST OF TABLES.....	iii
LIST OF FIGURES.....	iv
ABBREVIATIONS.....	v
ABSTRACT.....	vi
I 서 론.....	1
II 재료 및 방법.....	8
1. 연구대상 검체.....	8
2. 시약및기구.....	10
3. 검사방법.....	11
(1).도말검사.....	11
(2). 배양검사.....	12
(3). 오염제거(Decontamination).....	12
(4). 다중중합효소연쇄반응(Multiplex-PCR)을 통한 균 감별.....	13
(5).신속감수성검사.....	13
4. 검사결과 분석.....	19
III 결 과.....	20
1. 도말검사 결과 현황.....	20

2. 배양검사 결과 현황.....	20
3. 도말검사 결과 비교.....	20
4. 다중중합효소연쇄반응(Multiplex-PCR)의 결과.....	23
5. 신속감수성검사 결과.....	25
6. 검사결과 소요 일 수 비교.....	29
IV 고 찰.....	31
V 적 요.....	34
VI 참고문헌.....	35

LIST OF TABLES

Table 1.	<i>rpoB</i> gene of mutation and wild type.....	5
Table 2.	<i>katG</i> gene of mutation and wild type.....	6
Table 3.	<i>inhA</i> gene of mutation and wild type.....	7
Table 4.	PCR amplification protocol.....	15
Table 5.	Detection number of Auramine-O stain.....	21
Table 6.	Detection number of Mycobacteria by culture.....	22
Table 7.	Comparison of detection number of Mycobacteria from the first sputum smears and second sputum smears.....	22
Table 8.	GenoType MTBDR <i>plus</i> test results for detection of RMP, INH susceptibility/ resistance in smear positive sputum specimens.....	28
Table 9.	Turn around time of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> detection from two times consecutively requested sputum specimens from the same patents.....	30

LIST OF FIGURES

Figure 1. 2% Ogawa contamination Media.....	9
Figure 2. Examples for banding patterns and their evaluation with respect to rifampicin and/or isoniazid resistance.....	18
Figure 3. Photographs of same sample showing different views and concentrations (grades) of acid-fast bacilli in different stain methods.....	21
Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the multiplex PCR products.....	24
Figure 5. Results of Rapid Drug Susceptibility Testing with the Geno-Type MTBDRplus (GTplus) assay.....	27

ABBREVIATIONS

- PCR.....Polymerase Chain Reaction
- RMP.....Rifampicin
- INH.....Isoniazid
- NTM.....Non-tuberculosis Mycobacterium
- DEN.....Denaturation Solution
- HYB.....Hybridization Buffer
- STR.....Stringent Wash Solution
- RIN.....Rinse Solution
- CON-C.....Conjugate Concentrate
- CON-B.....Conjugate Buffer
- SUB-C.....Substrate Concentrate
- SUB-B.....Substrate Buffer
- CC.....Conjugate Control
- AC.....Amplification Control
- TUB.....Tuberculosis
- WT.....Wild type
- MUT.....Mutations

ABSTRACT

Study on the Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis*

Using by PCR and GenoType MTBDRplus in Contaminated Specimen

Heo Ryeun

Advisor: Prof. Yang Young, Ki , Ph. D

Department of Biotechnology

Graduate School of Chosun University

There are several methods to diagnose a tuberculosis patient, such as smear, PCR, tuberculosis culture, X-ray. For a proper treatment in the medical treatment, antimicrobial susceptibility test and rapid drug susceptibility testing would be operated. Tuberculosis bacilli usually needs from 3~8 weeks of culture period because it synthesis delay RNA and needs 15~22 hours for generation. After a germ raises in culture, we put in operation antimicrobial susceptibility test for a proper treatment. It has some difficulties to give a proper prescription for a tuberculosis patient because antimicrobial susceptibility test requires 4 weeks. To supplement this, we are developing and

practicing drug susceptibility testing which makes us know sensibility of RMP and INH that is representative tuber after 2 or 3 days. But this is possible just when more than 2 positive germs are detected and impossible with a small quantity of germ, we should practice rapid drug susceptibility testing with culture test. But if media is polluted by other germs except *Mycobacterium tuberculosis*, it's hard to interpret result about culture test and to practice antimicrobial susceptibility test and rapid drug susceptibility testing. Because we have to practice again smear, culture test after extracting specimen from the patient, time is consumed and proper patient treatment is postponed. To make up for these discomfort and quick patient treatment, rapid drug susceptibility testing is practiced by using GenoType MTBDRplus method. As a result, we gained sensibility 7 case and resistance 3 case other 1 case toward medicals from the total 11 test. By this, we gained conclusion that we can practice rapid drug susceptibility testing from the polluted specimen after eliminate a pollution source in culture and proved that we can practice rapid examination for a tuberculosis patient.

I. 서 론

인류에게 과거에서 현재에 이르기까지 많은 생명을 앗아간 병원균 중 하나가 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis complex*)이다. 결핵균은 사람에게 결핵을 일으키는 원인균으로서 1882년에 Robert Koch에 의해서 발견되었다. (Goodfellow와 Wayne, 1982). 그러나 다른 동물에서도 결핵이 발생하기 때문에 사람에게 결핵을 일으키는 균을 인형결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)이라 하고 소나 들쥐에 일으키는 균을 각각 우형결핵균(*Mycobacterium bovis*), 서형결핵균(*Mycobacterium microti*)이라 부른다(Skerman 등. 1989).

결핵균은 iodine을 필요로 하지 않는 Gram positive와 항산성 염색성을 띤다(Tom, 1979). 인공 배지 상에서 발육한 결핵균을 보면 분열증식한 균들이 서로 엉켜 붙어 균 덩어리가 마치 뱀처럼 보여 이것을 균색(serpentine cord)이라 한다. 형태적으로도 20nm 두께의 세포벽에는 60% 이상의 mycolic acid와 같은 독특한 지방산이 주축이 되는 지방화합물을 함유하고 있어 염료가 잘 침투하지 않아 석탄산과 같은 매염제를 첨가해 주어야 염료가 지방에 용해되어 균세포내로 확산되어 염색이 된다. 균세포내로 침투한 염료는 acid alcohol과 같은 강한 탈색제로 처리해도 탈색되지 않고 남게 되기 때문에 항산성(acid fast) 염색성이라 한다(Barksdale과 Kim, 1977). 지방 함량이 높은 세포벽으로 인해 나타나는 균의 또 다른 특성은 물리화학적으로 매우 유독한 환경에서 오랫동안 생존해 있을 수 있고 살균제에 대한 저항력도 매우 크며 숙주 방어수단에 대한 강한 저항력을 갖는다. 특히 여러 해 동안 휴지상태로 생존할 수 있어서 다른 세균들에 비해서 잠복기가 길다(Mitchison, 1981). 굵기는 $0.2\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m}$ 길이가 $2\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ 정도 되는 막대균(간균)으로서 운동성도 없고 내생 또는 외생포자도 생산하지 않는다(Grange, 1992). 결핵균의 감염경로는 전염성이 있는 환자가 기침 또는 대화를 할 때 결핵균이 밖으로 나오면 곧 수분은 증발하여 작은 비말 핵이 되어 떠다니다가 미감염자가 흡입하게 되면 비강, 기관지의 점막 및

폐의 폐포상피 등에 이르러 정착하게 된다(Arrud 등, 1993).

결핵의 진단방법으로는 도말검사, PCR검사, 배양검사, X-ray 촬영 등으로 폐결핵의 진단과 치료경과를 관찰하고 있으며, 적절한 치료를 위해서는 약제감수성검사와 신속감수성검사 등을 통해 환자에서 검출된 균의 약제 내성 여부를 판단하여 적절한 처방으로 신속하게 환자를 치료하는데 사용 된다.

도말검사는 비용이 저렴하고 검사결과를 신속하게 얻을 수 있고 도말 양성인 환자는 배균 량이 많아 배양 양성 환자보다도 감염 위험이 5~20배나 더 높기 때문에 환자관리와 치료경과의 관정에 매우 유용하다. 그러나 광학현미경을 이용하여 1000배의 배율로 300시야 정도를 검경 하였을 때 3~9개의 균이 있어야 양성으로 보고한다. 그러나 객담 1ml에 결핵균체가 최소한 1~3만개 이상의 균 이 있어야 현미경으로 관찰이 가능하기 때문에 민감도는 배양검사보다 떨어지는 단점이 있다(Groothuis와 Yates , 1991).

배양검사는 균체를 검출할 수 있는 민감도가 도말검사에 비해 훨씬 높아 객담 1ml에 발육 가능한 균이 10개만 있어도 검출 된다. 그리고 균을 분리 배양해야 정확한 균종을 동정할 수 있고 각종 항결핵제에 대한 감수성검사도 실시할 수 있기 때문에 매우 중요한 검사 방법이다. 그러나 결핵균의 세대당 증식 시간이 15~22시간으로 인해 검사결과가 보고되기까지는 3~8주정도의 시간이 걸리고 검사 조작 과정이 복잡하고, 어려워 숙련된 검사자와 많은 기자재를 필요로 하는 단점이 있다(Jin 등, 1989). 다중중합효소연쇄반응(multiplex-PCR)은 고온균으로부터 얻은 DNA중합효소를 이용해 창안한 primer-directed DNA중합효소연쇄반응법은 민감도와 특이도가 매우 높아 각종 병리 가검물 내 병원균 검출에 널리 이용되며 특히 결핵균처럼 분리배양에 오랜 시간이 걸리는 병원균의 검출에 매우 유용하다(Saiki 등, 1988). 약제감수성검사는 환자 치료 시에 적절한 약제를 처방하는데 매우 유용하다. 특히 초기 치료에 실패한 환자에 대해서는 감수성검사결과가 유용한 재 치료 처방 선정에 도움이 된다. 일반적인 방법으로는 절대농도법(absolute concentration method), 내성비례법(resistance ratio method), 내성비율법(proportion method)등이 있는데 대부분의 검사실이 절

대농도법(absolute concentration method)과 내성비율법(proportion method)을 이용한다(Padungchan 등. 1987). 그러나 약제감수성검사는 4주정도의 시간이 걸린다는 단점이 있다. 신속감수성검사법은 약제감수성검사의 검사 결과 판독까지 시간이 오래 걸린다는 단점을 보완하고, 신속하고 적절한 처방을 하기위해서 매우 유용하게 사용되어지고 있다. 최근 rifampicin(RMP)과 isoniazid (INH) 등을 포함한 2가지 이상의 약제에 내성이 있는 다제내성 결핵이 증가하여 문제화되면서 좀 더 빨리 약제감수성검사 결과를 얻고자 하는 필요성이 부각되면서 많은 연구와 노력 끝에 몇 년 전부터 신속감수성 검사법이 시행되고 있다. 결핵의 1차 치료약제 중 대표적인 RMP과 INH에 대한 내성은 다제내성의 보조지표로 이용되고 있기 때문에 현재 이 두 약제에 대한 내성여부를 2일 안에 신속하게 확인할 수 있는 검사법이 결핵환자의 치료에 효과적으로 사용되어지고 있다(Vijdea 등. 2008).

결핵의 진단과 적절한 치료를 위해 객담검사를 실시한다. 의뢰된 객담을 가지고 도말검사, 배양검사 등의 검사를 실시하는데 배양검사 중에 기타 잡균 등으로 인하여 배지가 오염이 되었을 경우에 현재까지는 오염된 검체를 멸균처리 후 폐기하였다. 그리고 해당 검체의 의뢰자를 확인하여 의뢰자로부터 객담을 재 채담하여 검사를 다시 실시하게 된다. 이런 과정 중에 결핵 환자는 그 시간만큼 치료가 지연이 되고 적절한 치료를 받지 못하게 되어 환자의 상태는 악화가 될 것이다. 내성균을 보유한 환자라면 내성이 생겨 버린 해당 약제를 복용해야 하는 효과 없는 치료를 받게 될 것이다. 또한 다른 사람에게 내성균을 전파하는 전염 원으로서의 역할을 하게 되므로 심각한 상황을 초래할 수 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해서는 신속한 결핵환자의 발견과 적절한 치료로 인한 전염성을 미리 차단하는 방법이 시급할 수밖에 없다. 이러한 것들을 해결하는 방안으로 객담 배양검사 중 오염이 된 검체를 폐기하지 않고 검사에 활용함으로써 검사에 필요한 경제적 손실과 환자를 치료하는데 걸리는 시간을 줄일 수 있는지를 알아보기로 했다. 먼저 오염된 검체에서 PCR을 이용하여 검체 내에 인형결핵균의 존재 유무를 확인한 후 최근에 개발되어 검사에 활용되어지고 있는 DNA-strip 기술을 기초로 하여 다중중합효소연쇄반응 후 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의

야생형과 돌연변이형에 특이한 probe와(Table 1,2,3) 접합된 Strip에 역교잡시켜 RMP와 INH 내성을 동시에 진단하는 원리를 이용한 GenoType[®]MTBDR*plus*를 가지고 신속감수성검사가 가능한지를 실험하기로 했다. 실험에서 유용한 결과가 도출 되었을 시에는 객담이 의뢰되어 배양 중에 오염 될 경우 객담을 재 채담을 요구하여 재의뢰 되는 날까지의 소요 일수와 오염된 검체에서 신속감수성 검사를 실시하여 검사결과가 나오기까지의 소요 일수를 비교한 후 그 소요되는 일수의 차이를 파악하여 환자를 치료하는데 시간적인 낭비를 줄일 수 있다는 것을 증명함으로써 앞으로 결핵환자 치료에 적극 활용하여 그동안 부적절한 처방과 치료시간의 지연 등을 방지하여 환자의 신속한 완치를 통해 결핵 없는 건강한 사회를 만들 수 있기를 희망하며 본 연구를 실시하게 되었다.

Table 1. *rpoB* gene of mutation and wild type

Failing wild type probe(s)	Codons analyzed	Mutation probe	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505 - 509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510 - 513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510 - 517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513 - 519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516 - 522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518 - 525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526 - 529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530 - 533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

※ *rpoB* wildtype-probes : WT1 to WT8

The MTBDR strip contains 17 probes, including 5 amplification and hybridization controls to verify the test procedures. For the detection of RMP resistance, five *rpoB* wild-type probes (probes WT1 to WT5) encompass the region of the *rpoB* gene encoding amino acids 509 to 534. Four probes (probes *rpoB* MUT D516V, *rpoB* MUT H526Y, *rpoB* MUT H526D, and *rpoB* MUT S531L) specifically target the most common mutations.

Table 2. *katG* gene of mutation and wild type

Failing wild type probe(s)	Codons analyzed	Mutation probe	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

※ The detection of INH resistance, one probe covers the wild-type S315 region of *katG*, while two others (probes *katG* MUT T1 and MUT T2) are designed to assess the AGC-to-ACC (S315T) and the AGC-to-ACA (S315T) mutations

Table 3. *inhA* gene of mutation and wild type

Failing wild typeprobe(s)	Codon analyzed	Mutation probe	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

※ The promoter region of the *inhA* gene is included on the new strip and encompasses the regions from positions -9 to -22 for the *inhA* WT1 probe and positions -1 to -12 for the *inhA* WT2 probe. Four mutations (-15C/T, -16A/G, -8T/C, and -8T/A) can be targeted with the *inhA* MUT1, MUT2, MUT3A, and MUT3B probes.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상 검체

2008년 1월부터 2008년 12월까지 대한결핵협회 광주·전남지부 검사사업과에 접수된 광주광역시 및 전라남도 보건소에서 의뢰된 객담(sputum) 18,241개를 각각 도말검사와 배양검사를 실시하였다. 이중에서 도말검사에서 양성이면서 배양검사에서 오염된 검체를(Fig. 1) 대상으로 도말검사를 다시 실시하여 양성임을 확인한 후 그 균이 인형결핵균인지 비결핵항산균(non-tuberculosis mycobacterium; NTM)인지를 확인하기 위하여 다중중합효소연쇄반응(applied biosystems geneAmp PCR system 9700)을 실시하여 인형결핵균으로 확인되면 신속감수성검사를 실시하여 RAMP와 MINH에 대한 내성여부를 검사하였다.

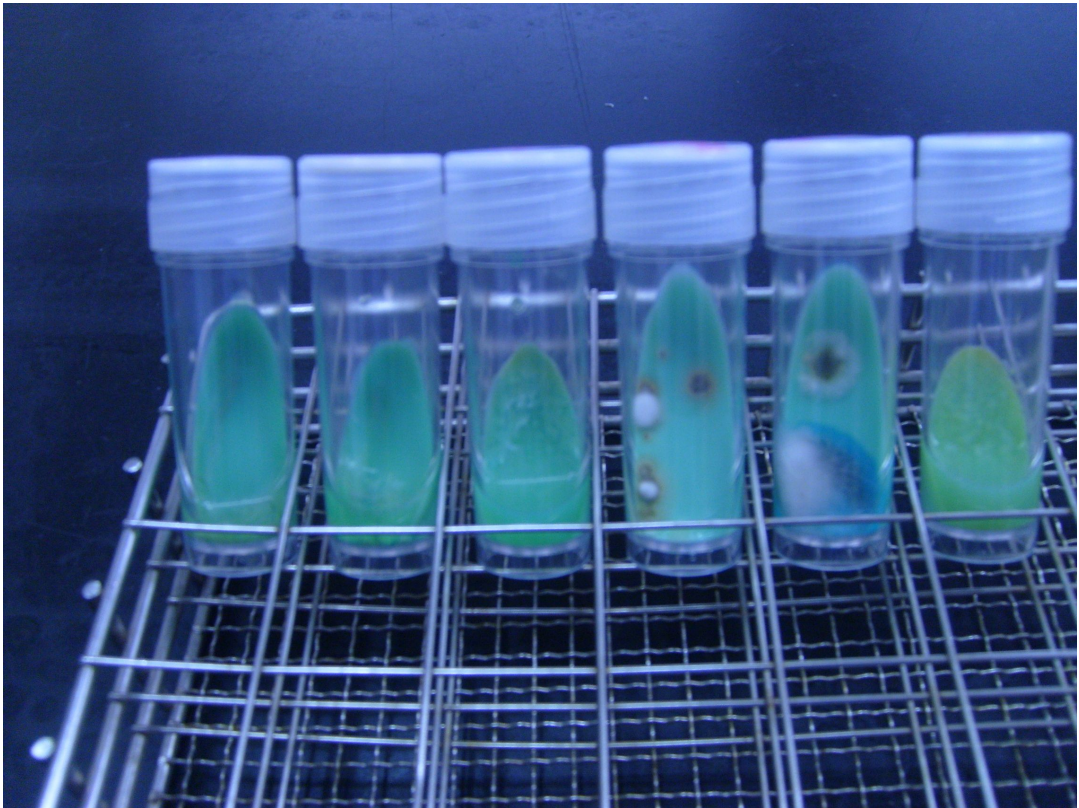


Figure 1. 2% Ogawa contamination media of Genus *Mycobacterium*

2. 시약 및 기구

도말검사 시약으로는 염색액으로 phenol auramine stain solution(auramine 3g, glycerol 150ml, phenol crystal 20g, D.W. 1,000ml)으로 염색하였고 탈색액으로는 1% HCL-alcohol solution(Conc-HCL 20ml, sodium chloride 20g, 75% ethyl alcohol 1,500ml, D.W. 460ml)을 사용하였으며, 대조 염색액으로 0.2% potassium permanganate solution(potassium permanganate 2g, D.W. 1,000ml)을 사용하였다. 배양검사 시약으로는 전처리제인 4% NaOH(NaOH 40g, D.W 1,000ml)를 사용하였고 배지로는 2% Ogawa(KH₂PO₄ 2gm, sodium glutamate 1gm, D.W. 100ml, 2% malachite green 6ml, glycerine 6ml, whole egg 200ml)를 사용하였다. 균 감별을 위한 PCR검사에서는 5× TB primer, 8-mop solution, 2× multiplex master Mix 등을 혼합액으로 사용하였고, 오염을 제거하기 위해서는 NALC/NaOH(4% NaOH, 2.9% sodium citrate, 0.5g NALC powder)을 사용하였으며, 신속감수성검사에는 GenoType[®] MTBDR*plus* KIT에 포함된 시약들을 사용하였다. 장비로는 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, Thermo-cycler, 교반기, 수조, vortex mixer 등을 사용하였다.

3. 검사방법

(1). 도말검사(smear)

객담은 loop를 사용하여 가급적 객담의 농양부위를 채취하도록 하였다. 일반적으로 농양부위가 타액에 비해 균 검출율이 높으므로(약 20배 이상) 검사용 객담 선정에 각별히 유의하였다. 채취된 객담을 슬라이드 중앙부에 놓고 가로 2cm, 세로 1cm 정도의 크기로 고르게 바른 뒤 도말 면이 위로 향하게 하여 실온에서 15~30분간 자연 건조 시켰다. 자연 건조된 슬라이드를 염색대 위에 올려놓고 화염봉으로 슬라이드 밑 부분을 3~4회 통과시키며 고정을 한 다음 phenol auramine stain solution 염색액을 충분히 붓고 15~20분간 염색한 다음 증류수로 염색액을 잘 씻어낸 뒤 1% HCL-alcohol solution 용액으로 1분간씩 2회 탈색 한 다음 수세하였다. 그런 다음 2% potassium permanganate solution 염색액으로 1분간 대조 염색을 실시하였다. 다시 수세한 후 슬라이드 뒷면을 거즈나 종이 타올을 이용하여 깨끗이 닦아낸 후 슬라이드 건조대에서 건조시켰다. 완전히 건조된 슬라이드를 형광현미경으로 검경하여 결핵균의 존재 여부를 판독하였다(Groothuis와 Yates, 1991).

(2). 배양검사(culture)

배양용으로 멸균된 담통에 받은 객담에 4% NaOH를 동량을 가한 다음 vortex mixer를 이용하여 객담을 균질화 한 다음 실온에서 15분간 전처리 과정을 거친 다음 응고수를 제거한 2% Ogawa 2분에 0.1ml씩 접종하여 접종된 배지는 사면으로 고르게 문게 하여 뚜껑을 느슨하게 하여 37℃ 배양실에 24시간 방치하여 과잉 응고수를 조절 후 뚜껑을 막아서 rack에 꽂아 8주 동안 균 발육 유무를 관찰하였다(Collins 등. 1985).

(3). Decontamination(오염 제거)

NaOH는 소화 및 오염제거 작용하는 물질로서 4% 농도에서 점액 용해력이 가장 높다. 그러나 NaOH 4% 농도는 오염균 뿐만 아니라 일부 결핵균에도 독성이 있으며 농도를 2%로 낮추면 독성 작용을 줄일 수 있다. 소화와 오염제거 기간은 결핵균의 분리율에 결정적인 영향을 준다. 그러므로 NaOH 농도는 소화와 오염제거를 효과적으로 할 수 있는 가장 낮은 농도를 사용해야 하며 2% NaOH에서 오염률이 높으면 오염제거 시간을 늘리는 것보다는 NaOH의 농도를 3-4%로 증가시키는 것이 바람직하다. 많은 검사실에서는 이러한 점들을 고려하여 낮은 농도의 NaOH와 효과적인 점액 분해 물질인 NALC 또는 dithiothreitol을 병합하여 사용한다.(Tacquet, 1967) 이러한 이유로 오염된 검체를 4% NaOH와 2.9% sodium citrate를 동량으로 첨가하여 신선한 digestant를 준비한 다음 sodium hydroxide-sodium citrate 용액 100ml당 0.5g NALC powder를 첨가하였다. 모아진 검체를 50ml tube에 분주한 다음 검체와 동일한 양으로 NALC 용액을 첨가하여 뚜껑을 꼭 잠그고, tube를 혼합하였다. 표면에 묻어있는 NALC 용액을 확보하기 위해 15 - 20분간 세워둔 뒤 총량이 50ml이 되도록 멸균 PBS(pH 6.8)를 Tube에 채워 손으로 혼합하였다. 3,000xg의 속도로 15분 동안 원심·분리하여 검체를 농축한 다음 조심스럽게 pellet으로부터 상층액을 제거하고 최종양이 1 - 3 ml이 되기까지 멸균된 피펫을 사용하여 PBS(pH 6.8)로 pellet 침전물을 현탁하였다(Hillemann, 2006).

(4). 다중중합효소연쇄반응(Multiplex-PCR)을 통한 균 감별

오염된 검체를 PCR의 정확도와 인형결핵균의 검출율을 높이기 위해 4% NaOH와 2.9% sodium citrate를 동량으로 첨가하여 신선한 digestant를 준비하여 sodium hydroxide-sodium citrate 용액 100ml당 0.5g NALC powder를 첨가하여 오염을 제거하였다. 검체를 vortex 한 후 13,000rpm에서 2분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 D.W 1ml를 넣어 pellet를 풀어준 다음 13,000rpm으로 2분 동안 원심분리를 2회 반복 실시 한 뒤 상층액을 버리고 침전물을 DNA 추출에 사용하였다. DNA extraction solution을 잘 섞은 다음 전 처리한 검체에 200 μ l를 첨가하여 잘 섞은 다음 heating block 100 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 heating하였다. 13,000rpm에서 2분 동안 원심분리 한 후 상층액 중 3 μ l 을 PCR tube에 넣고 4 μ l 5 \times TB primer, 3 μ l 8-mop solution, 10 μ l 2 \times multiplex master mix를 혼합한 뒤 94 $^{\circ}$ C로 예열된 PCR기기에서 반응 시킨 후 TB1- Marker와 PCR 결과물을 5 μ l을 채취하여 1.5% agarose gel에서 결과를 확인하였다.

(5). 신속감수성검사(Antimicrobial susceptibility test)

GenoType[®]MTBDRplus는 DNA-STRIP[®] 기술을 기초로 하여 다중중합효소연쇄반응 후 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 probe가 접합된 Strip에 역교잡시켜 RMP와 INH 내성을 동시에 진단하는 것을 원리로 한다(Vijdea 등. 2008).

임상적인 의의는 GenoType[®]MTBDRplus는 항산균 도말염색 양성인 폐 검체 또는 배양된 박테리아에서 결핵균 및 RMP와 INH 내성균을 검사하는 분자유전학적 신속 결핵다제내성 측정에 의의가 있다(Barnard 등. 2008). 사용하는 검체로는 항산성 집균도말검사 양성인 폐 검체, 고체배지 및 액체배지에서 자란 항산균주를 사용하고, 검체를 보관 하는 방법으로는 객담의 경우 냉장보관 시 채담 후 적어도 1주일 이내에 처리해야 한다. 도말염색 양성인 폐 검체는 NALC/NaOH를 사용하여 처리하며, 검체 처리 후 가능한 빠른 시간 안에 DNA를 추출한다(Hillemann, 2006).

1). DNA 추출-고체배지

접종 loop로 채취 한 검체를 멸균된 증류수 300 μ l에 부유한 다음 부유한 박테리아를 vortex로 잘 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열하여 비활성화 시킨 다음 60 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 초음파 처리하였다. 10,000g로 5분 동안 원심·분리하여 상층액을 다중중합효소연쇄반응에 사용하였다(Mäkinen 등. 2006).

2). DNA 추출-액체배지

액체배지 1ml을 채취하여 10,000g로 15분 동안 원심·분리한 다음 상층액을 제거하고 멸균된 증류수 100-300 μ l를 첨가하여 vortex로 혼합한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 가열하여 비활성화 시켰다. 60 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 초음파 처리한 뒤 10,000g로 5분 동안 원심·분리하여 상층액을 PCR반응에 사용하였다(Mäkinen 등. 2006).

3). 다중중합효소연쇄반응(Multiplex-PCR)

검체 1개 당 PCR 마스터혼합액을 45 μ l를 사용하며, 검사하고자 하는 검체 수에 따라 필요한 양의 PCR 마스터 혼합액을 Table 4와 같이 조제하였다. 모든 PCR tube에 PCR 마스터 혼합액 45 μ l씩을 분주하고 추출된 DNA 5 μ l씩을 각각의 PCR tube에 분주한 후 PCR 반응을 시작하였다. PCR 반응조건은 Table 4와 같다(Miotto 등. 2006).

Table 4 PCR amplification protocol

Time/Temperature	Cycle	
	culture	suptum
5분 95℃	1 cycle	1 cycle
30초 95℃	10 cycles	10 cycle
2분 58℃		
25초 95℃		
40초 53℃	20 cycles	30 cycle
40초 70℃		
8분 70℃	1 cycle	1 cycle

4). Hybridization

오염이 제거된 검체 1개 당 PCR 마스터혼합액을 45 μ l를 사용하여 검사하고자 하는 검체 수에 따라 필요한 양의 PCR 마스터 혼합액을 조제하였다. 모든 PCR tube에 PCR 마스터 혼합액 45 μ l씩을 분주하고 추출된 DNA 5 μ l씩을 각각의 PCR tube에 분주한 후 PCR 반응을 시작하였다(Miotto 등. 2006). Tray의 각각의 well에 denaturation solution(DEN)을 20 μ l씩 분주 한 다음 각 well에 PCR 산물 20 μ l씩 분주하여 피펫으로 혼합하여 실온에 5분 동안 두었다. 기다리는 동안 필요한 만큼의 strip을 깨끗한 종이에 두고 color marker 아래 연필로 일련번호를 기입하였다. 예열된 hybridization buffer (HYB) 1ml을 각 well에 분주 후 가볍게 혼합하고 각 well에 일련번호를 기입한 strip을 첨가했다. +45 $^{\circ}$ C/30분/300rpm으로 교반하여 배양하였고 필요한 만큼의 conjugate concentrate (CON-C)와 conjugate buffer(CON-B), substrate concentrate (SUB-C)와 substrate buffer(SUB-B)를 각각 1:101 희석하여 조제하였다. HYB를 버리고 예열된 STR 1ml씩 분주하고 +45 $^{\circ}$ C/15분/300rpm으로 교반하여 배양했다. Stringent wash solution(STR)을 버리고 rinse solution (RIN) 1ml씩 분주하여 실온(+25 $^{\circ}$ C)/1분/300rpm으로 교반하여 세척한 다음 RIN을 버리고 희석한 conjugate solution(CON) 1ml을 각 well에 분주하여 실온/30분/300rpm으로 교반하여 배양했다. CON을 버리고 각 well에 RIN 1ml을 분주하여 실온/1분/300rpm으로 교반하여 세척하고 RIN을 버리고 다시 RIN 1ml을 분주하여 실온/1분/300rpm으로 교반하여 세척하고 RIN을 버리고 멸균증류수 1ml을 분주하여 실온/1분/300rpm으로 교반하여 세척한 다음 흡습지에 tray를 가볍게 털어서 잔여액을 제거하고 조제한 substrate를 1ml씩 분주하여 암소/실온에서 3분 ~ 20분간 배양하였다. 증류수로 2회 세척하고 반응이 끝난 strip을 평가용지에 붙여서 판독하였다(Miotto 등. 2006).

5) 결과 판정

결과 판정은 GenoType[®]MTBDR*plus*의 결과분석 및 판정지침(Fig. 2) 이용하여 판독하였다. conjugate control (CC), amplification control (AC), tuberculosis (TUB), locus control은 모두 양성일 때 검사가 정상적으로 수행되었음을 의미하고 나머지 band로 결과를 판독하였다. TUB 음성은 시험한 검체에 결핵균이 포함되어 있지 않으므로 결과를 판독할 수 없었다. AC 음성일 때는 PCR 단계가 잘못되었거나 PCR 저해제의 영향을 받았을 가능성이 있으므로 재시험을 수행하였다. *rpoB*는 모든 wild type(WT)이 양성이고 mutant type(MUT)이 음성이면 RMP 감수성으로 판정하였고 WT가 음성이고 MUT가 양성이면 RMP 내성으로 판정하였다. WT이 음성이고 MUT가 음성이면 RMP 내성으로 판정하였다. *katG*는 모든 WT가 양성이고 MUT가 음성이면 INH 감수성으로 판정하였다. WT가 음성이고 MUT가 양성이면 INH 내성으로 판정하였으며, WT가 음성이고 MUT가 음성이면 INH 내성으로 판정하였다. *inhA*는 모든 WT가 양성이고 MUT가 음성이면 INH 감수성으로 판정하였다. WT가 음성이고 MUT가 양성이면 INH 내성으로 판정하였고 WT이 음성이고 MUT가 음성이면 INH 내성으로 판정하였다(Mäkinen 등. 2006).

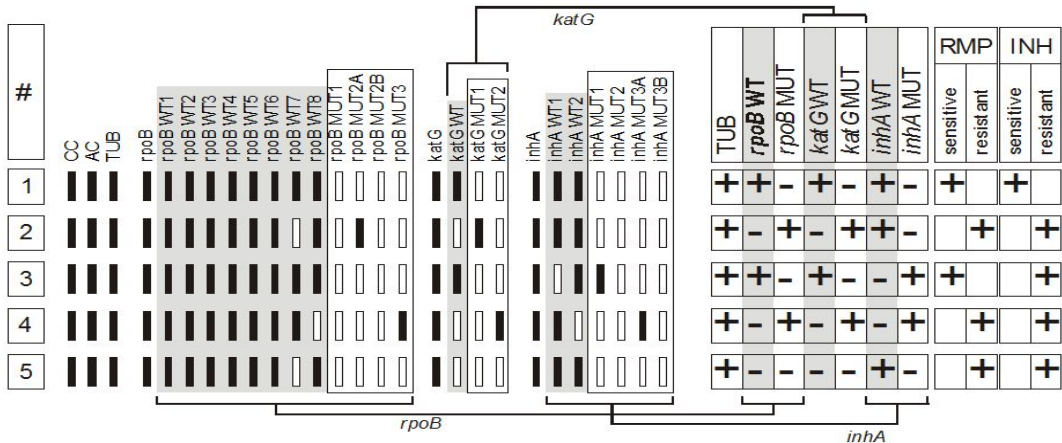


Figure 2. Examples for banding patterns and their evaluation with respect to rifampicin and/or isoniazid resistance. Example 1 shows the wild type banding pattern. All wild type probes display a signal, but none of the mutations probes; hence, the evaluation chart has a “+” in the three wild type columns and a “-” in the three mutation columns. Accordingly, the boxes for rifampicin (RMP) and isoniazid (INH) are marked as sensitive. One of the rpoB and the katG wild type probes are missing in example 5; hence, the boxes for rpoB WT and katG WT are marked with a “-”. As none of the mutation probes are developed, these boxes are also marked with a “-”. The inhA promoter region does not deviate from the wild type pattern. The strain is evaluated as RMP and INH resistant. The INH resistance is caused by a mutation in the katG gene and is therefore a high level isoniazid resistance.

4. 검사결과 분석

도말검사를 실시한 검체는 형광현미경으로 검경한 뒤 각각 검사의 결과를 음성, 양성 등으로 기록하고, 배양 접종을 하였다. 배양된 균주는 7일 간격으로 배양판독을 하여 오염과 음성 그리고 양성으로 결과를 기록하였다. 기타 잡균 등으로 인하여 오염된 배지는 도말검사를 실시하여 positive 결과가 나왔을 경우에는 오염원을 제거하고 PCR 검사를 통해 인형결핵균 여부를 확인 한 후 GenoType[®]MTBDR*plus*로 RMP과 INH 내성 여부를 검사하였다. 처음 접수했던 날부터 소요되는 일수를 기록하였고 도말검사에서 음성일 경우에는 수검자를 확인하여 가검물을 재 채담하여 의뢰 해 줄 것을 요구하고 재 의뢰된 검체는 다시 도말검사, 배양검사를 실시하였다. 도말검사 양성인 검체는 같은 과정들을 거쳐서 신속감수성검사를 실시하여 처음 접수 되었던 날부터 결과가 나오기까지의 소요 일 수를 기록하여 비교하였고 도말검사 음성일 경우 검체는 배양을 하여 균이 자라서 내성검사 결과가 나오기까지 처음 접수했던 날부터의 소요 일 수를 기록하여 각각 소요되는 일수를 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 도말검사 결과 현황

2008년 1월부터 12월까지 광주광역시 및 전라남도 29개 보건소에서 의뢰된 객담 총 18,241건 중 도말검사를 실시 한 후 형광현미경으로 검경한 결과 Fig. 3과 같은 양상을 보였고 Table 5에서 보는 바와 같이 음성18,083건(99.1%), 양성 158건(0.9%)의 결과를 얻었다.

2. 배양검사 결과 현황

검체를 4% NaOH(NaOH 40g, D.W. 1,000ml)로 균질화 등과 잡균을 제거한 뒤 15분간 실온에 방치 한 뒤 2% Ogawa에 0.1ml를 배지 사면에 접종하여 배양 한 뒤 일주일 간격으로 판독 한 결과 Table 6에서와 같이 총 18,241건 (100%) 중 양성 396건(2.1%), 음성 17,485건(95.9%), 오염 173건(0.9%), NTM 187건(1.0%) 등의 결과를 얻었고 오염으로 판정된 총 173건(100%) 중 도말양 성에서 오염 13(7.5%)건, 도말음성에서 오염은 160건(92.4%)의 결과가 나왔다.

3. 도말검사 결과 비교

배양검사 중 기타 잡균이나 세균에 의해 오염된 배지를 분리하여 도말검사 결과를 분석해 본 결과 오염으로 판정 된 검체의 수는 총 173(0.9%)건이었다. 이중 처음 실시했던 도말검사 결과 중 음성에서 오염이 160건(92.4%), 양성에서 오염이 13건(7.5%)으로 분석 되었다. 그리고 배양검사 오염검체를 재 채담 하여 도말검사를 실시하고 결과를 분석한 결과 총 13건(100%) 중에서 음성 5 건(38.4%), 양성 7건(53.8%), 미 의뢰 1건(7.6%)등으로 분석되었다(Tabl. 7).

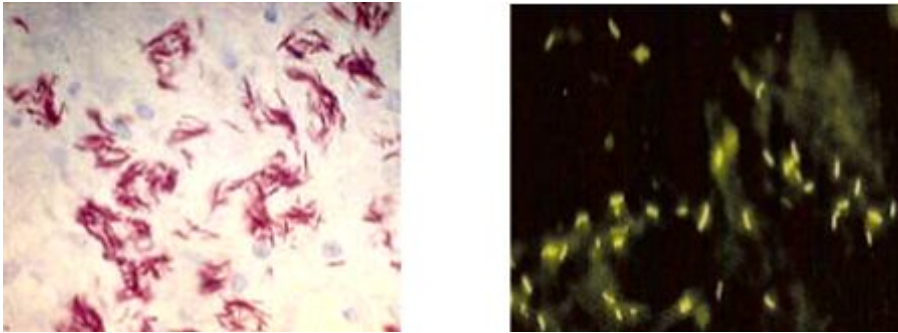


Figure 3. Photographs of same sample showing different views and concentrations (grades) of acid-fast bacilli in different stain methods; A: Acid fast bacilli stain ($\times 1000$) and B: Auramine fluorochrome stain ($\times 200$).

Table 5. Detection number of Auramine-O stain

Smear after 4% NaOH treated		
Positive	Negative	Total
158(0.9%)	18,083(99.1%)	18,241(100%)

Centrifuge state : 3500 rpm, 15 min, 30 fields per slide observation (250 \times)

Table 6. Detection number of Mycobacteria by culture

Culture after 4% NaOH treated					
Total	Positive	Negative	NTM	Contamination	
18,241(100%)	396(2.1%)	17,507(95.9%)	187(1.0%)	173(0.9%)	
				Smear +	Smear -
				13(7.5%)	160(92.4%)

All of specimens cultured for 2% Ogawa media

Table 7. Comparison of detection number of Mycobacteria from the first sputum smears and second sputum smears

First sputum	Second sputum		
13(100%)	Positive	Negative	N/A
	7(53.8%)	5(38.4%)	1(7.6%)

First sputum: All positive.

Second sputum: Positive 11, Negative 1, N/A: not available 1.

4. 다중중합효소연쇄반응(Multiplex-PCR)의 결과

도말검사 양성 중 배양 검사 오염으로 판정되어진 검체를 인형결핵균과 비결핵 항산균 여부를 감별하기 위해 오염 된 검체를 4% NaOH와 2.9% sodium citrate를 이용해서 전 처리한 검체에 200 μ l를 첨가하여 잘 섞은 다음 heating block 100 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 heating하였다. 13,000rpm에서 2분 동안 원심분리한 후 상층액을 3 μ l 덜어내어 PCR tube에 넣고 4 μ l 5 \times TB primer, 3 μ l 8-mop solution, 10 μ l 2 \times multiplex master mix를 혼합한 뒤 94 $^{\circ}$ C로 예열된 PCR기기에서 반응 시킨 후 TB1- marker와 PCR 결과물을 5 μ l을 채취하여 2% agarose gel에서 결과를 확인 한 결과(Fig. 4), 배양검사 중 오염으로 판정된 총 13건(100%) 중 인형결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 11건(84.6%), 음성(NTM의심) 2건(15.3%)의 결과를 얻을 수 있었다.

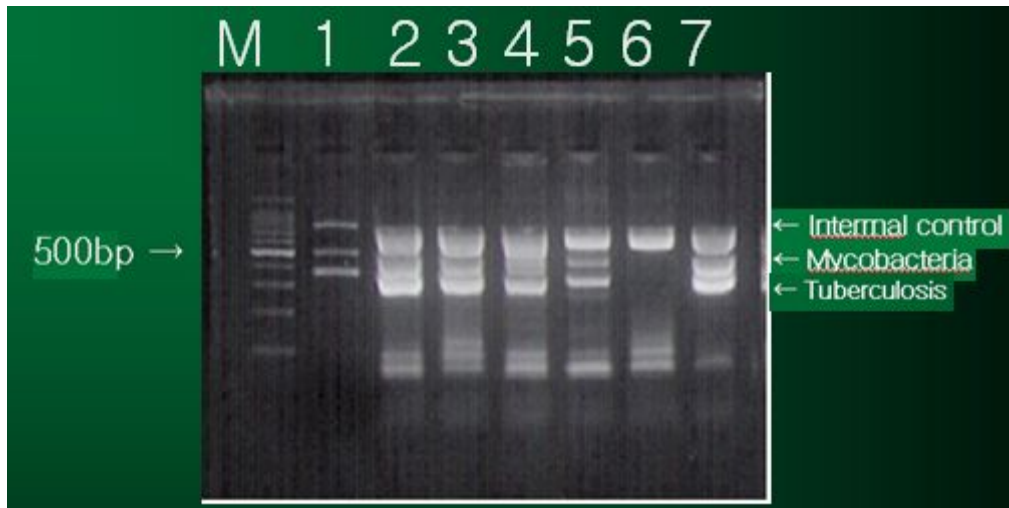


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the multiplex PCR products.
M: 100 bp ladder (Seegene Cat. No. M0100), 1: Internal control,
2 ~ 5: Tuberculosis, 6: Mycobacteria 7: Tuberculosis

5. 신속감수성검사 결과

배양검사 오염으로 판정된 검체를 오염원을 제거하고 PCR검사를 통해 인형결핵균과 비결핵항산균으로 감별한 뒤 인형결핵균으로 판정된 검체를 GenoType MTBDR_{plus}를 이용하여 검체 1개 당 PCR 마스터혼합액을 45 μ l를 사용하여 검사하고자 하는 검체 수에 따라 필요한 양의 PCR 마스터 혼합액을 조제하였다. 모든 PCR tube에 PCR 마스터 혼합액 45 μ l씩을 분주하고 추출된 DNA 5 μ l씩을 각각의 PCR tube에 분주한 후 Table 5와 같이 PCR 반응을 한다(Miotto 등, 2006).

PCR 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 probe가 접합된 스트립에 역교잡시켜 RMP와 INH에 대한 내성검사(Fig. 5)한 뒤 GenoType[®] MTBDR_{plus} 결과 분석표(Fig. 2)를 참조하여 분석한 결과 1번 검체에 서는 CC가 양성으로 hybridization이 양호하게 진행되었음을 알 수 있었고, AC 또한 양성으로 PCR반응이 정상적으로 수행되었음을 확인할 수 있었으며, TUB가 양성으로 반응하여 결핵균이 존재함을 확인한 후 판독을 한 결과 *rpoB*WT가 모두 양성, *rpoB*MUT는 음성으로 판정되어 RMP에 감수성임을 판정할 수 있었다. *katG*의 경우 WT가 양성, MUT가 음성 등의 결과를 확인하였고 *inhA*는 WT가 양성, MUT가 음성 등의 결과를 나타내었으므로 INH에 대해 감수성으로 판정하였다. 3번 검체는 CC는 양성으로 확인되기는 하였지만 AC와 TUB가 음성으로 확인되어 정상적인 검사가 진행되지 못하였으므로 인식하여 검사 불능으로 판정하였다, 7번 검체는 CC, AC, TUB가 양성으로 확인되어 정상적인 검사가 수행되었고 결핵균이 포함되어 있음 확인하고 판정한 결과 *rpoB*WT가 모두 양성, *rpoB*MUT는 음성으로 판정되어 RMP에 감수성임을 확인할 수 있었다. 반면에 *katG*의 경우 WT가 양성, MUT가 음성 등의 결과를 보여 INH에 대한 감수성으로 판정할 수 있으나 *inhA*가 WT1에서 음성, MUT1에서 양성을 보였으므로 INA에 대한 내성으로 판정하였다. 이러한 방법으로 나머지 검체들을 판정 한 결과 총 검사한 11건 중 RMP 내성은 0건, 감수성은 10 건, INH 내성은 3건, 감수성은 7건, 검사 불능 1건의 결과를 얻었다(Table. 8). 이로써 객담을 도말 검사하여 양성일 경우에 2 % Ogawa 배지에 접종하여 배양 하였을 때 잡균으로 인해 오염되었을 경우에도 오염원을 제거하고 PCR 과정을 거쳐 신속

감수성검사를 실시하여 유의한 결과를 도출함으로써 그동안의 오염된 배지를 멸균하여 폐기처리 하지 않고 바로 RMP와 INH 내성을 동시에 진단할 수 있음을 증명하게 되었다.

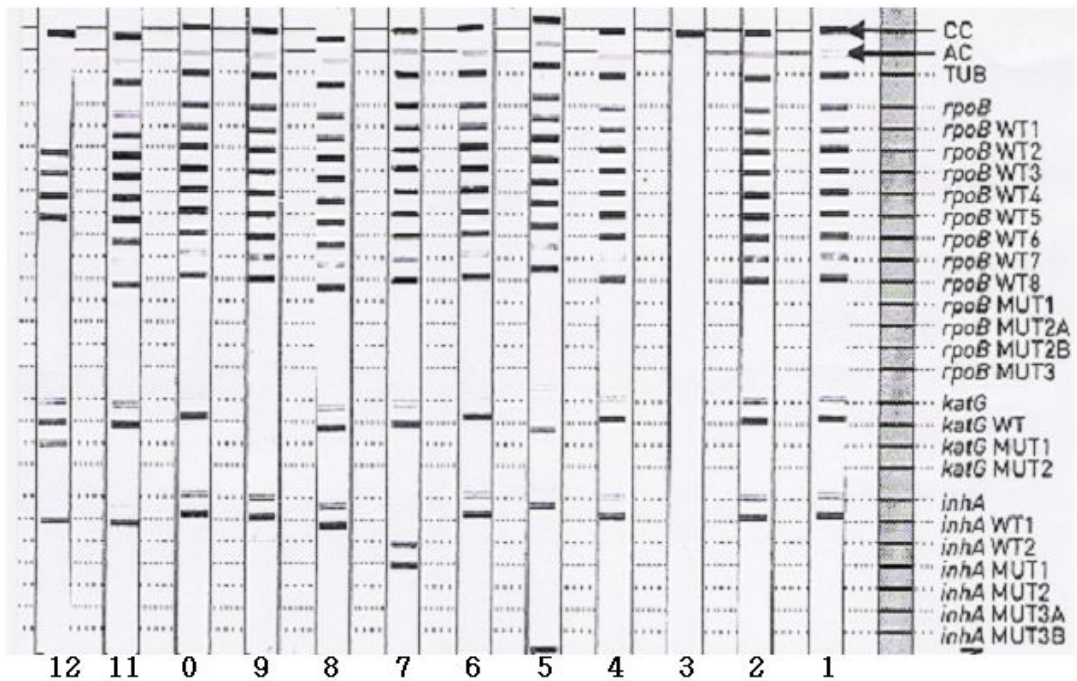


Figure 5. Results of Rapid Drug Susceptibility Testing with the GenoType MTBDRplus (GTplus) assay.

RMP/INH, Susceptible(S), Resistant(R):

1 R^S/I^S, 2 R^S/I^S, 3 Not *Mycobacterium tuberculosis*, 4 R^S/I^S, 5 R^S/I^R, 6 R^S/I^S, 7 R^S/I^R,
8 R^S/I^S, 9 R^S/I^R, 10 R^S/I^S, 11 R^S/I^S, 12 Negative control.

Table 8. GenoType MTBDR*plus* test results for detection of RMP, INH susceptibility/ resistance in smear-positive sputum specimens

GenoType MTBDR <i>plus</i> assay result (number of strans)				
	Susceptible	Resistant	Not determined	Total
RIM	10(90.9%)	0(0%)	1(9.0%)	11(100%)
INH	7(63.6%)	3(27.2%)	1(9.0%)	11(100%)

susceptible: RMP = 10, INH = 7, resistant: RMP = 0, INH = 3

6. 검사결과 소요 일 수 비교

보건소를 통해 의뢰되었던 검체 중에 도말검사 결과 양성으로 배양검사 오염으로 판정된 경우 해당 검체에 대해 재의뢰 요구를 하여 재의뢰된 검체의 접수 날까지의 소요 일수와 처음 배양검사에서 오염으로 판정되어 오염원을 제거 PCR 검사를 거쳐 신속감수성검사를 실시하여 검사 결과를 얻기까지의 소요 일수를 비교하였더니 Table 9와 같은 결과를 얻었다. 총 오염된 13건의 검체 중에서 PCR 검사에서 음성으로 판정된 검체 2건과 미 의뢰된 1건을 제외한 10건을 비교한 결과 평균 13.1일의 차이가 있었다. 이는 배양검사에서 오염된 검체를 멸균처리 하여 폐기한 다음 재채담하여 검사를 하기까지의 소요되는 13.1일이라는 기간 동안 환자는 적절한 치료를 받지 못하는 상황에 처할 수 있고 그만큼 결핵을 전파 시킬 수 있는 위험성을 내포하고 있다는 것을 제시하고 있다. 또한 오염된 검체에서 신속감수성검사를 바로 실시할 수 있으므로 신속하게 결핵환자에게 적절한 처방을 할 수 있어 결핵환자를 치료하는데 많은 도움이 될 수 있다는 것을 시사한다.

Table 9. Turnaround time of *Mycobacteria tuberculosis* detection from two times consecutively requested sputum specimens from the same patents

(unit: day)

Number	Culture days ^A	PCR Results	R.D.S ^B days	Interim closing ^C	Request days	Total days ^D	Delay days ^E
1	14	+	2	16	8	24	8
2	12	+	2	14	11	25	11
3	11	+	2	13	14	27	14
4	9	+	2	11	10	21	10
5	7	+	2	9	no request		
6	11	+	2	13	9	22	13
7	10	+	2	12	11	23	12
8	10	+	2	12	17	29	12
9	15	+	2	17	10	27	17
10	12	+	2	13	7	20	13
11	19	+	2	21	10	31	21

A: smears + culture days

B: Rapid Drug Susceptibility Testing

C: Contamination days + R.D.S days

D: Interim closing + Request days

E: Total days - Interim closing

IV. 고 찰

결핵은 유사 이래 인간과 같이 존재해온 질환으로 우리 인류에게 가장 많은 생명을 앗아간 병원균이다. 18세기 후반부터 19세기 전반에 걸쳐 영국의 산업혁명이 일어나면서 인구의 도시집중에 따른 밀집 생활, 위생상태의 악화, 적절한 관리방법의 부재 등이 겹치면서 결핵이 폭발적으로 만연하게 되었다. 우리나라는 일제 식민지 시대, 한국 전쟁에 따른 기아와 피란 생활에 따른 좁은 지역에서 밀집 거주, 영양 부족, 관리체계가 겹치면서 결핵이 만연하는 계기가 되었다. 전 세계적으로 결핵 문제는 심각하여 2005년도 기준으로 880만 명($136/10^5$)의 결핵환자가 발생하고, 1,450만 명($217/10^5$)이 앓고 있으며, 사망자 수도 158만 명($24/10^5$)이 될 것으로 추정된다(WHO, 2007). 우리나라는 1965년 실태조사 때는 연간 결핵감염 위험률이 5.3%이던 것이 체계적인 결핵관리사업 등으로 유행율이 꾸준히 감소하여 1995년에는 0.5%로 감소되었다(보건복지부, 1995). 그러나 보건소 등록환자를 대상으로 한 약제내성률은 1999년에는 11.3%였으며 2004년에는 12.8%로 변화가 있었고 다제내성환자의 비율도 1.6%에서 2.7%로 유의하게 증가하였다(Bai 등, 2007). 우리나라의 결핵은 비록 감소 추세에 있지만 다른 국가와 비교할 때 아직 심각한 것은 분명하다. 최근 고령층의 증가, 외국인 근로자의 지속적인 유입, HIV 감염자의 증가, 북한주민의 유입과 교류 활성화 등을 고려하면 향후에는 감소 추세의 둔화내지 일시적인 증가 추세로 전환할 것으로 보고 있으며 특히 유의할 점은 다제내성 환자의 증가와 10~20대 등을 비롯한 젊은 층의 결핵환자 증가에 관심을 가지고 지켜봐야 할 것으로 본다. 결핵의 주 전염원은 객담 도말 양성인 폐결핵 환자가 기침, 재채기, 말, 노래 등을 할 때 결핵균이 들어 있는 비말 핵이 배출되어 이 공기 중에 떠 있다가 다른 사람의 호흡기도로 들어가서 호흡세기관지나 폐포에 도달하면 감염을 일으킨다(Grange, 1988). 결핵의 진단으로는 투베르쿨린 피부반응 검사, 도말검사, 배양검사, PCR 반응검사, X-ray법등이 있으며, 적절한 치료를 위한 검사로는 약제감수성검사, 신속감수성검사, 균감별검사, 균동정검사 등이 있다. 도말검사는 기법이 간단하고 저렴하며 어디서나 쉽게 이용할 수 있고 결과가 빨라 환자관리에 편리하며, 도말검사로 발견되는 환자가 그 지역사회의 결핵 감염원이므로 빨리 찾아내어 치료해야 할 뿐 만아니라 임상증상도 심해 치료를 시급하

게 요하는 환자들이다(Toman, 등. 1979). 배양검사는 결핵균을 동정할 수 있어서 확실한 진단이 가능하고 소수의 균도 검출 할 수 있으며 약제감수성검사를 위해서는 반드시 필요하지만 균의 세대증식 기간이 길어 결과보고까지 시간이 오래 걸리는(3~8주) 단점이 있다(김 등, 1986). 약제감수성 검사는 환자 치료 시에 각 항결핵제에 대한 감수성 여부를 검사하여 적절한 치료 처방을 위해 아주 유용한 검사다. 그러나 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다(Kent and Kubica, 1985). DNA 중합효소 연쇄반응(PCR)법은 고온균으로부터 얻은 DNA 중합효소를 이용한 DNA를 증폭합성법은 민감도와 특이도가 매우 높아 각종 병리 가검물 내 병원균 검출에 널리 이용된다(Saikt 등. 1988). 신속감수성검사는 다중중합효소연쇄반응 후 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 probe가 접합된 스트립에 역교잡시켜 RMP와 INH 내성을 동시에 진단하는 것으로 2일 만에 내성 여부를 알 수 있기 때문에 신속하고 적절한 처방을 하는데 매우 유용하게 쓰인다(Vijdea 등. 2008).

본 연구는 요즘 다제내성결핵균이 증가하여 사회적, 국가적으로 민감한 상황에 직면하고 있음을 인식하여 조기에 내성균 감염자를 찾아내어 신속하고 적절한 치료할 수 있게 하여 더 이상의 내성균의 전파를 막고 환자에게도 빠른 완치로 행복하고 건강한 삶을 영위할 수 있도록 도움을 주기위해서 실시하게 되었다. 현재까지 도말검사 결과 양성인 검체 중에 배양검사에서 잡균에 의한 오염으로 판독이 불가능한 경우에는 다시 재채담 의뢰를 하여 검사를 할 수 밖에 없는 문제점이 있었다. 그만큼 시간적, 경제적으로 환자에게 피해가 가는 것을 방지하고 환자의 빠른 완치를 위해서 오염된 균주에서 오염원을 제거하여 신속감수성검사를 실시하게 되었고, 처음 의뢰되어서 배양 중에 오염되었던 검체를 신속감수성검사를 실시하여, 그 결과를 얻기까지의 시간과 오염된 검체의 대상자에게 재 채담을 요구하여 객담을 접수하는 날까지의 소요되는 일수를 서로 비교하여 본 실험의 목적을 증명하려 하였다. 그래서 가장 먼저 대상 기간 동안 의뢰되었던 모든 검체를 대상으로 도말검사를 실시하였으며 매일 검사의 결과를 음성, +, ++, +++등으로 기록하였다. 그 결과 총 18,241건(100%) 중에서 음성 18,083건(99.1%), 양성 158건(0.9%)등의 결과를 얻었다. 그리고 2% Ogawa 배지에 0.1ml씩 접종하고 매주 배양결과를 판독하여 음성, +, ++, +++, ++++등으로 기록하였다. 그 결과 Table 6과 같이 총 18,241건(100%) 중 음성 17,507건(95.7%), 양성 396건(2.1%), NTM 187건(1.0%), 오염 173건(0.9%) 등의 결과를 얻었다. 그리

고 배양 중에 오염된 검체를 분리 하여 도말검사 결과를 확인 후 양성인 경우에는 다중중합효소연쇄반응을 실시하여 인형결핵균 여부를 확인한 결과 인형결핵균 11건, 비결핵항산균 의심 2건, 등으로 확인되었다. PCR에서 인형결핵균으로 확인 된 검체는 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 probe가 접합된 strip에 역교잡시켜 RMP과 INH 내성여부를 검사한 결과 Table 8과 같이 RMP에는 0건이 내성이고, 10건이 감수성 이었다. INH에서는 3건이 내성이고 7건이 감수성으로 보였으며, 검사 불능 1건의 결과를 얻었다. 그리고 처음 의뢰 된 검사의 도말검사의 결과와 재의뢰 시 도말검사 결과를 비교한 결과 총 오염된 13건 중 도말검사 결과 양성 7건, 음성이 5건, 미 의뢰 1건의 결과를 얻게 되었다. 그리고 신속감수성검사의 결과보고까지의 소요된 일수와 배양 오염되어 재 채담하여 접수 시까지의 소요 일수를 비교한 결과 13.1일이라는 기간이 소요됨을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 도말검사 결과 양성 환자는 전염성이 있으므로 빠른 시간에 적절한 치료를 해서 전염성을 없애고, 완치될 수 있도록 최대한 신속한 검사가 이뤄져야 한다. 처음 도말검사 시에 현미경검사 결과 2 positive 이상의 결과와 PCR 검사에서 결핵균으로 판정되면 객담으로도 신속감수성검사가 가능 하나 도말검사 음성이거나 2 positive 이하인 경우나 PCR 음성 경우에는 불가능하므로 배양실에서 균을 더 배양하여 증식시킨 후에 신속감수성검사를 실시해야 한다. 그리고 배양 중에 오염이 되면 현재까지는 그 검체는 배양검사 결과 오염으로 판독불가가 되어 멸균 처리 후 폐기 시키고 다시 의뢰를 요구하여 처음부터 검사를 다시 해야 하는 번거로움과 시간적, 경제적인 것은 물론 환자 치료에도 적절한 처방이 내려 지지 않음으로 인해 문제가 발생하였다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구를 실시한 결과 배양 중 검체가 오염이 되더라도 오염원을 제거 하고, 신속감수성검사를 실시 할 수 있음을 증명하였다. 이런 결과를 기초로 한다면 결핵환자에 치료에 있어 문제점이 되는 검체 오염으로 인한 검사불능, 진단 시간의 지연, 부적절한 처방 등의 문제점을 해결할 수 있어 결핵환자 치료에 큰 도움이 될 것이라고 사료된다.

V. 적 요

인류가 생겨나고 가장 많은 고통을 준 결핵은 현재까지도 우리 주위에 머물며 우리의 생명을 노리고 있다. 다행히 많은 학자들이 결핵균에 대한 지속적인 연구를 통해 다양한 항결핵제가 개발되어 결핵치료에 유용하게 사용 되어지고 있으나 항결핵제의 부적절한 처방과 결핵에 대한 환자들의 이해 부족으로 지속적인 약 복용을 하지 않아 다제내성결핵균이 증가하고 있는 심각한 상황에 접하게 되었다. 이에 본 연구는 결핵균의 진단방법 중에 하나인 객담검사를 이용하여 2008년 1월부터 12월까지 결핵협회 광주전남지부에 의뢰 된 18,241건(100%)의 검체를 대상으로 도말검사를 실시한 결과 양성 158건(0.9%), 음성 18,083건(99.1%)의 결과를 얻었고 배양검사에서는 양성 396건(2.1%), 음성 17,507건(95.9%), 비결핵항산균 187건(1.0%), 오염 173건(0.9%)등의 결과를 얻었다. 오염된 검체 중 도말검사 양성인 검체 13건(100%)을 따로 분리하여 오염을 제거한 뒤 PCR 검사를 실시한 결과 양성 11건(84.6%), 음성 2건(15.3%)의 결과를 얻었다. PCR 결과 양성인 검체는 RMP와 INH에 대한 내성검사를 실시하였다. 그 결과 총 11건(100%)의 검사건수 중 RMP의 감수성은 10건(100%), 내성은 0건(0%), INH에서는 감수성이 7건(63.6%), 내성이 3건(27.2%), 검사 불능 1건(9.0%) 등의 결과를 얻었다. 또한 결핵균 배양용 배지에서 오염으로 인한 검체에서도 RMP와 INH에 대한 내성검사가 가능함을 증명하였다. 그리고 오염된 검체는 해당 의뢰자들에게 재 채담을 요구하여 재의뢰 된 객담을 도말검사 배양검사를 실시하였고 재 접수 시까지의 소요 일수를 기록하고 처음 오염 검체에서 RMP와 INH에 대한 내성검사 결과 보고 일수와 비교 하였을 때 13.1일이라는 소요 일수가 차이가 남을 알 수 있었다. 이는 오염된 검체에서 RMP와 INH에 대한 내성검사를 실시하여 신속하고 정확하게 결핵으로 고통 받는 환자들에게 적절한 항결핵제의 처방과 치료를 할 수 있어 완치율을 높이는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

본 논문에서는 신속한 결핵환자의 치료와 결핵균검사 시의 문제점을 해결하기 위한 방안을 연구하여 제시하며, 결핵균검사에 관련한 연구가 앞으로도 계속 되어져야 할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Arruda S., Bomfim G., Knights R., Huima-Byron T., and Riley L.W. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science*, 261(5127):1454-7, 1993.
2. Bai G.H., Park Y.K., Choi Y.W., Bai J.I., Kim H.J., Chang C.L., Lee J.K., and Kim S.J. Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. *Int J Tuberc Lung Dis*, 11(5):571-6, 2007.
3. Blair E.B., Brown G.L., and Tull A.H. Computer files and analyses of laboratory data from tuberculosis patients. II. Analyses of six years' data on sputum specimens. *Am Rev Respir Dis*, 113(4):427-32, 1976.
4. Barnard M., Albert H., Coetzee G., O'Brien R., and Bosman M.E. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(7):787-92, 2008.
5. Barksdale L., and Kim K.S. Mycobacterium. *Bacteriol Rev*, 41(1):217-372, 1977.
6. Brossier F., Veziris N., Truffot-Pernot C., Jarlier V., and Sougakoff of resistance to rifampin and isoniazid in strains of Mycobacterium tuberculosis with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol*, 44(10):3659-64, 2006.
7. Collins C. H., Grange J. M., and Yates M.D. Organization and Practice in Tuberculosis Bacteriology. *Butterworth-Heinemann Press*, p.125, 1985.
8. Grange J.M. Mycobacteria and Human Disease A Hodder Arnold Publication. *Edward Arnold Press*, p.62-89, 1988.
9. Grange J.M. The mystery of the mycobacterial 'persistor'. *Tuber Lung*

Dis, 73(5):249–51, 1992.

10. **Goodfellow M., and Wayne L.G.** Taxonomy and nomenclature, In Ratledge C, Stanford S(ED). The biology of Mycobacteria, *Academic Press*. p.471–521, 1982.
11. **Groothuis D.G., and Yates M.D (ED).** diagnostic and public health mycobacteriology, 2nd ed. Bureau of Hygiene and Tropical diseases, 1991.
12. **Hillemann D., Rüsç-Gerdes S., and Richter E.** Application of the Genotype MTBDR assay directly on sputum specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(9):1057–9, 2006.
13. **Hillemann D., Rüsç-Gerdes S., and Richter E.** Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 45(8):2635–40, 2007.
14. **Jin B.W., Hong Y.P., and Kim S.J.** A contact study to evaluate the BCG vaccination programme in Seoul. *Tubercle* Dec, 70(4):241–8, 1989.
15. **Kent P.T., and Kubica G.P.** Public health Mycobacteriology. a Guide for the Level III Laboratory. *Atlanta, Georgia, DHHS, CDC*, p.35, 1985.
16. **Mäkinen J., Marttila H.J., Marjamäki M., Viljanen M.K., and Soini H.** Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 44(2):350–2, 2006.
17. **Miotto P., Piana F., Penati V., Canducci F., Migliori G.B., and Cirillo D.M.** Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol*, 44(7):2485–91, 2006.
18. **Mitchison D.A.** The mycobacteria. In Scientific foundation of respiratory medicine. J.G. Cumming and W. M. thurlbeck. ed., *William Heinemann*

- Medical book Lt*, 371–383, 1981.
19. **Padungchan S., Konjanart S., Kasiratta S., Daramas S., and ten Dam H.G.** The effectiveness of BCG vaccination of the newborn against childhood tuberculosis in Bangkok. *Bull World Health Organ*, 64(2):247–58, 1986.
 20. **Padungchan S., Konjanart S., Kasiratta S., Daramas S., and ten Dam H.G.** Vaccination programme in Seoul. *Tubercle*, 70:241, 1987.
 21. **Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., and Erlich H.A.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermo-stable DNA polymerase. *Science*, 239:487–91, 1988.
 22. **Skerman V.B.D., McGowan V., and Sneath P.H.A.** Approved lists of Bacterial name. *American Society for Microbiology*, p.93–97, 1989.
 23. **Somoskovi A., Dormandy J., Mitsani D., Rivenburg J., and Salfinger M.** Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J Clin Microbiol*, 44(12):4459–63, 2006.
 24. **Tacquet A., Tison F., Devulder B., and Roos P.** Techniques for decontamination of pathological specimens for culturing mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc*, 39:21–4, 1967.
 25. **Timpe A., and Runyon E.H.** The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med*, 44(2):202–9, 1954.
 26. **Tom K.** How can progress of treatment result be assessed?. In Tuberculosis. Geneva. *World Health Organization*, p.179, 1979.
 27. **Vijdea R., Stegger M., Sosnovskaja A., Andersen A.B., Thomsen V.Ø., and Bang D.** Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27(11):1079–86, 2008.

28. **WHO report.** World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. *WHO report*, 2007.
29. 보건복지부., 대한결핵협회., 제7차 결핵실태조사결과보고, 1995.
30. 김상재., 배길한., 황해도., 객담 내 결핵균 검출방법의 효율성 비교. *결핵 및 호흡기질환* 36:354-361, 1989.