

세포 염색 방법을 이용한 결핵균 감수성 검사법

결핵연구원¹, 고려대학교 생명공학원², 식품의약품 안정청³, 서울대학교 의과대학⁴

류성원^{1,2}, 김현호², 방문남¹, 박영길¹, 박순희³, 심영수⁴, 강성만², 배길한¹

=Abstract=

Trial for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with Live and Dead Cell Differentiation

Sung-Weon Ryu, M.Sc.^{1,2}, Hyun-Ho Kim, M.Sc.², Mun-Nam Bang, M.Sc.¹,
Young-Kil Park, Ph.D.¹, Sue-Nie Park, Ph.D.³, Young-Soo Shim, M.D.⁴,
Seongman Kang, Ph.D.², Gill-Han Bai, Ph.D.¹

¹Department of Microbiology, Korean Institute of tuberculosis,

²Graduate School of Biotechnology, Korea University

³Korea Food & Drug Administration, ⁴Seoul National University College of Medicine

Background : The resurgence of tuberculosis and outbreaks of multidrug resistant (MDR) tuberculosis have increased the emphasis for the development of new susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* for the effective treatment and control of the disease.

Conventional drug susceptibility testings, such as those using egg-based or agar-based media have some limits, such as the time required and difficulties in determining critical inhibitory concentrations, but these are still being used in many diagnostic laboratories because of no better alternatives, considering cost and accuracy. To overcome these limits, a rapid and simple method for new susceptibility testing, using live and dead assays, was applied for a bacterial cell viability assay to distinguish dead from live bacterial cells based on two-color fluorescence.

Materials and Methods

Strains : Forty strains were used in this study, 20 susceptible to all antituberculosis drugs and the other 20 resistant to the four first line antituberculosis drugs isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol.

Antibiotics : The four antibiotics were dissolved in 7H9 broth to make the following solutions: 0.1μg

본 연구는 보건복지부 Korea Health 21 R&D Project 지원에 의하여 이루어진 것임. (03-PJ1-PG1-21400-0001)

Address for correspondence:

Gill Han Bai, Ph.D.

Korean Institute of Tuberculosis

14 Woomyundong, Socho-gu, Seoul 137-900

Phone : 02-577-5766 Fax : 02-573-1914 E-mail : gbai@hotmail.com

isoniazid(INH)/ml, 0.4 μ g rifampicin(RMP)/ml, 4.0 μ g streptomycin(SM)/ml and 4.0 μ g ethambutol(EMB)/ml.

Results : Live and dead *Mycobacterium tuberculosis* cells fluoresced green and red with the acridin (Syto 9) and propidium treatments, respectively. These results are very well accorded with conventional drug susceptibility testing by proportional method on Lowensen-Jensen media (L-J) containing 4 drugs (INH, RMP, EMB and SM), showing a 93.7 % accordance rate in susceptible strains and 95% in resistant strains.

Conclusion : The results of the drug susceptibility testing using the live and dead bacterial cell assay showed high accordance rates compared with the conventional proportion method on L-J. This finding suggests that the live and dead bacterial cell assay can be used as an alternative to conventional drug susceptibility testing for *M. tuberculosis* strains. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:261-267)

Key words : Tuberculosis, Live and dead cell, Susceptibility testing.

서 론

결핵치료에서 어려움을 겪게 되는 가장 중요한 요인 중의 하나가 약제 내성균에 감염된 경우이다¹. 근래 다제내성 결핵균의 증가는 신속한 결핵균 감수성검사 방법 개발에 대한 필요성을 더욱 증가시키고 있다². 전 세계에서 새로 발생한 결핵 환자 가운데 약 3.2 %가 결핵 약제에 대해 다제내성으로 보고 되고 있다³. 일단 초치료에 실패하면 재치료를 위해서 더 많은 의료 서비스와 고가의 약품을 사용해야하고 치료 성공률은 더 낮아지는 것이 일반적인 현상이다⁴.

결핵균의 약제내성 여부를 파악하기위해 전 세계적으로 가장 널리 쓰이는 검사법은 분리 배양된 균을 이용한 약제 감수성 검사방법이다⁵. 활발하게 개발이 진행되고 있는 분자생물학적 기법들이 신속한 내성여부의 구분에 많은 도움을 주고 있지만, 아직까지는 검사 약제가 제한되어 있고 여러 가지 보완할 점들이 많이 남아있다.

따라서 저자들은 결핵균 세포 염색 방법에 의해 생균(生菌)과 사균(死菌)을 구분함으로써 신속하고도 정확하게 결핵균의 내성여부를 판별하는 약

제 감수성 검사 방법을 검토하여 보았다.

대상 및 방법

1. 사용 균주 및 검사방법

본 연구의 대상으로 대표적인 4 가지 항결핵 약제 (Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin, Ethambutol)에 모두 내성인 임상분리 결핵균 20 균주와 모든 약제에 감수성인 임상분리 결핵균 20 균주를 사용하였다. 이들 40 균주는 각 각 다른 40명의 결핵 환자로부터 분리된 것이며, Lowensen-Jensen 배지에서 내성비율법에 의한 결핵균 약제 감수성 검사방법을 사용하여 약제 내성 여부가 결정되었다⁶. 이 결핵균에 대한 약제 감수성 검사는 결핵연구원 미생물부에서 실시되었다. 약제별 농도는 Isoniazid 0.2 μ g/ml, Rifampicin 40.0 μ g/ml, Streptomycin 4.0 μ g/ml, Ethambutol 2.0 μ g/ml 이었다.

2. 세포 염색

MacFarland #1 탁도를 멸균증류수로 10배 희석한

결핵균액을 7H9 배양액 30 ml에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음, 10,000 xg 에서 15 분간 원심 분리하였다. 결핵균주별 배양액에는 미국의 National Jewish Medical and Research Center에서 권장하는 농도의 약제를 첨가하였다⁷. 원심분리 후 상층액을 제거하고 2 ml의 증류수를 첨가하여 잘 섞은 후 20 ml의 멸균 증류수를 첨가하고 다시 한 번 원심분리 하였다. 이 과정을 1회 더 반복한 후 실온에서 15분 간격으로 잘 섞으면서 1 시간 동안 방치하였다. 마지막으로 남은 침전물을 10 ml의 멸균증류수로 현탁한 후 550 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 결핵균의 농도를 결정하였다. 핵산 염색액인 Syto 9 (Molecular Probes, USA) 과 세포질 염색액인 프로피디움 (propidium iodide, $C_{27}H_{34}I_2N_4$)을 2X 저장액으로 준비하고, 이 2X 저장액과 결핵균을 동일 용량으로 섞었다⁸. 이때 Syto 9 과 프로피디움의 최종농도는 각각 6 μ M 과 30 μ M 이 되도록 하였다. 염색액과 결핵균을 잘 섞은 후 실온의 암소에서 15분간 방치한 후 슬라이드에 5 μ l 씩 점적하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

결 과

실험에 사용한 약제내성 결핵균은 4가지 항결핵 약제의 각 농도가 함유된 7H9 배양액에서 사멸하지 않고 생존하고 있음을 형광 현미경상에서 확인할 수 있었다(Fig. 1, Fig. 2). 항결핵 약제에 내성 이면서 살아있던 결핵균은 95%가 녹색으로 염색되어 나타났으며, 항결핵 약제에 감수성으로 사멸한 결핵균체는 93.5%가 붉은색으로 염색이 되었다 (Table 1, 2).

이 결과는 대장균이나 살모넬라와 같은 세균에서 적용되던 세포 염색 방법이 결핵균 염색에도 유용하게 사용될 수 있음을 보여주었다. 실험에 사용한 두 가지 염색액 중에서 프로피디움(propidium iodide)은 살아있는 세균의 경우 세포핵은 염

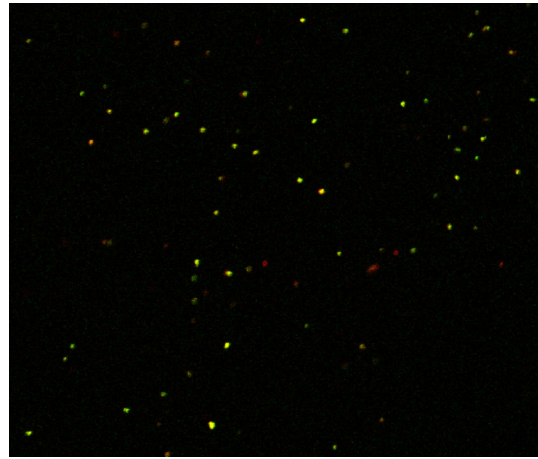


Fig. 1. Fluorescence microscopy of clinically isolated *M. tuberculosis*, which were susceptible to all antituberculosis drugs (Magnification x400).

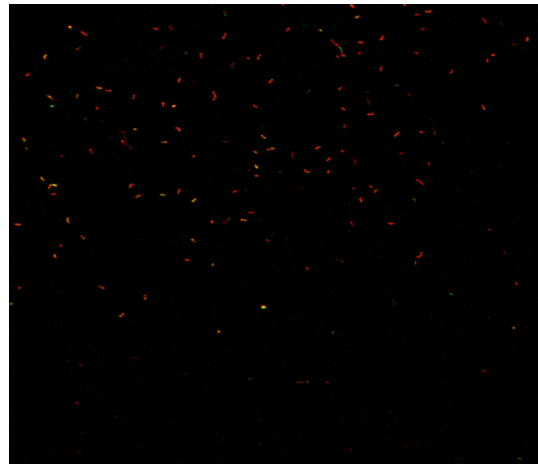


Fig. 2. Fluorescence microscopy of clinically isolated *M. tuberculosis*, which were resistant to all antituberculosis drugs (Magnification x400).

색시키지 못하고 세포질만 염색함으로써 살아있는 결핵균은 형광 현미경 시야에서 녹색을 띄게 되고, 세포의 핵산을 염색시키는 Syto 9은 사멸한 세포의 세포질을 통과하여 결핵 약제에 감수성인 결핵균의 세포핵을 염색시켜 형광 현미경 시야에서

Table 1. Mycobacterial cell colors under the microscopy (Total)

| Strains tested | Cell colors observed | | Total |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------|
| | No. of cells with Red | No. of cells with Green | |
| | (%) | (%) | |
| Susceptible strain | 18.75 (93.7) | 1.25 (6.3) | 20 |
| Resistant strain | 1 (5) | 19 (95) | 20 |

Table 2. Mycobacterial cell colors under the microscopy (Each drugs).

| Drug tested | Strains tested | Cell colors observed | | Total |
|-------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------|
| | | No. of cells with Red | No. of cells with Green | |
| | | (%) | (%) | |
| Isoniazid (INH) | Susceptible strain | 18 (90) | 2 (10) | 20 |
| | Resistant strain | 1 (5) | 19 (95) | 20 |
| Rifampicin (RIF) | Susceptible strain | 19 (95) | 1 (5) | 20 |
| | Resistant strain | 0 | 20 (100) | 20 |
| Streptomycin (SM) | Susceptible strain | 20 (100) | 0 | 20 |
| | Resistant strain | 1 (5) | 19 (95) | 20 |
| Ethambutol (EMB) | Susceptible strain | 18 (90) | 2 (10) | 20 |
| | Resistant strain | 2 (10) | 18 (90) | 20 |

붉은 색으로 관찰되었다.

고 찰

우리나라를 포함, 전 세계에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 결핵균에 대한 약제 감수성 검사 방법은 계란 또는 한천을 이용한 고체배지나 액체배지에 일정 농도의 약제를 함유시켜 대조배지에서의 균발육과 비교하여 내성여부를 결정하는 것이다. 고체배지를 사용할 때는 균의 발육 기간이 대개 3-4주 이상 오래 걸리며 액체배지 사용 시에는 검사기간은 다소 단축되지만 검사과정이 번잡스럽고 오염 기회가 높다. BACTEC 등과 같이 결핵균 대사과정에 생기는 CO₂와 O₂ 등을 측정함으로써 균의 발육 여부를 간접적으로 측정하는 자동 또는 반자동의 상품화된 방법도 개발되었고⁹⁻¹¹ 박테리 오파지를 결핵균 감수성 검사에 이용한 방법 등도 개발되었으나 현재까지 민감도와 특이도 및 표준화를 포함한 여러 문제점들을 완전히 해결한 방법

은 출현하지 못한 상태이다.

세포의 형광염색을 이용한 기존의 연구들은 세포의 사멸 및 생육을 판단하는 수단으로 이 방법을 사용하였을 뿐¹²⁻¹⁴ 결핵균의 약제감수성검사에 acridin (Syto 9)과 propidium 성분을 이용한 경우는 없었다. Live and dead cell assay의 민감도는 형광물질인 acridin 성분으로 되어있는 Syto 9이 어느 정도 세포핵을 염색시키느냐의 여부에 달려 있다. 결핵약제에 내성인 균은 propidium 색소에 의한 염색만 일어나므로 형광현미경시야에서 녹색으로 관찰된다. 그러므로 이 실험에서는 매우 신속하게 검사 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 배양된 균으로 검사 시 하루 정도의 검사 시간이 소요되었다.

미국의 National Jewish Medical and Research Center에서 권장하는 농도의 약제를 7H9 배지에 첨가하여 실험한 결과 배양 시간에 따라서 검사 결과에 많은 차이를 나타내었다. 37 °C에서의 24시간의 배양으로 항결핵 약제가 결핵균의 대사에 충

Table 3. Syto 9 color reaction by the staining time (Total)

| Time (minutes) | Susceptible strains | | | Resistant Strains | | |
|-------------------|---------------------|-----------|-------|---------------------|-----------|-------|
| | strain numbers with | | Total | strain numbers with | | Total |
| | Red (%) | Green (%) | | Red (%) | Green (%) | |
| 0 | 0 | 20 (100) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| 15 | 18.5 (92.5) | 6 (1.5) | 20 | 1 (5) | 19 (95) | 20 |
| 30 | 19.5 (97.5) | 0.5 (2.5) | 20 | 4.5 (22.5) | 15 (75) | 20 |
| 60 | 20 (100) | 0 | 20 | 15.75 (78.7) | 5 (25) | 20 |

Table 4. Syto 9 color reaction by the staining time (Each drug).

| Drug tested | Time (minutes) | Susceptible strains | | | Resistant Strains | | |
|----------------------|-------------------|---------------------|-----------|-------|---------------------|-----------|-------|
| | | strain numbers with | | Total | strain numbers with | | Total |
| | | Red (%) | Green (%) | | Red (%) | Green (%) | |
| Isoniazid (INH) | 0 | 0 | 20 (100) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| | 15 | 18 (90) | 2 (10) | 20 | 1 (5) | 19 (95) | 20 |
| | 30 | 19 (95) | 1 (5) | 20 | 5 (25) | 15 (75) | 20 |
| | 60 | 20 (100) | 0 | 20 | 15 (75) | 5 (25) | 20 |
| Rifampicin (RIF) | 0 | 0 | 20 (100) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| | 15 | 19 (95) | 1 (5) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| | 30 | 20 (95) | 0 | 20 | 4 (20) | 16 (80) | 20 |
| | 60 | 20 (100) | 0 | 20 | 16 (80) | 4 (20) | 20 |
| Streptomycin (SM) | 0 | 0 | 20 (100) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| | 15 | 19 (95) | 1 (5) | 20 | 1 (5) | 19 (95) | 20 |
| | 30 | 20 (100) | 0 | 20 | 5 (25) | 15 (75) | 20 |
| | 60 | 20 (100) | 0 | 20 | 17 (95) | 3 (15) | 20 |
| Ethambutol (EMB) | 0 | 0 | 20 (100) | 20 | 0 | 20 (100) | 20 |
| | 15 | 18 (90) | 2 (10) | 20 | 2 (10) | 18 (90) | 20 |
| | 30 | 19 (95) | 1 (5) | 20 | 4 (20) | 16 (80) | 20 |
| | 60 | 20 (100) | 0 | 20 | 15 (75) | 5 (25) | 20 |

분히 영향을 미치는 것으로 판단되었으며, 24시간 이하의 짧은 배양 시간은 약제가 작용하기에는 충분하지 못하였다. 또한 24시간 이상의 추가적인 배양 시간도 큰 의미가 없는 것으로 판단되었다.

항결핵 약제가 함유된 7H9 배지에서의 배양 시간보다, 검사 결과에 영향을 주는 더 중요한 사항은 두 가지의 형광 색소를 첨가한 이후의 경과 시간이었다. 실험 결과에서 나타난 바와 같이 15분을 정점으로 시간이 경과할수록 acridin 계열인 Syto 9의 침투성이 증가하여 약제 감수성 균은 물론 약제 내성균까지 모두 붉은 색으로 염색되는 현상을

보였다. 따라서 결핵균 세포의 염색 시간을 정확하게 유지하는 것이 이 실험의 관건인 것으로 판단되었다(Table 3, 4).

본 연구에서와 같은 세포 판별법이 기존의 결핵균 감수성 검사 방법을 대체하여 널리 사용되기 위해서는 적합한 형광현미경, 결핵균 세포의 민감한 염색을 위한 검사의 숙련도가 요구된다고 본다. 그러나 배양된 균으로 검사하는 데만 4주 이상 소요되는 기존의 결핵균 감수성 검사 방법을 대체할 수 있는 매우 저렴하고도 간편한 검사방법으로 간주되었다. 향후 검사방법을 표준화시키

고 정도 유지를 제대로 한다면 기존 방법을 대체할 수 있는 대안의 하나라고 판단되었다.

요 약

연구배경 :

결핵치료에서 어려움을 주는 가장 중요한 요인의 하나가 약제 내성균에 감염된 경우이다. 근래 다제 내성 결핵균의 증가는 신속한 결핵균 감수성검사 방법 개발에 대한 필요성을 더욱 증가시키고 있다. 활발하게 개발이 진행되고 있는 분자생물학적 기법들도 신속한 내성여부의 구분에 많은 도움을 주고 있지만, 아직까지는 검사약제가 제한되어 있고 보완할 점들이 많이 남아있다. 따라서 저자들은 결핵균 세포 염색 방법에 의해 생균과 사균을 구분할 수 있는 신속하고도 정확한 결핵균 약제 감수성 검사 방법을 검토하여 보았다.

방 법 :

본 연구의 대상으로 대표적인 4가지 항결핵 약제(Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin, Ethambutol)에 모두 내성인 임상분리 결핵균 20 균주와 모든 약제에 감수성인 임상분리 결핵균 20 균주를 사용하였다. 약제감수성검사의 최소 희석배수였던 Mac Farland #1 탁도로부터 10배 희석한 결핵균액을 7H9 배양액 30 ml에 접종한 후 37 °C에서 24시간 배양한 다음, 핵산 염색액인 Syto 9 (Molecular Probes, USA)과 세포질 염색액인 프로피디움(propidium iodide, $C_{27}H_{34}I_2N_4$)을 결핵균과 잘 섞은 후 실온의 암소에서 15 분간 방치한 후 슬라이드에 5 μ l 씩 점적하여 형광 현미경으로 관찰하였다.

결 과 :

실험에 사용한 약제내성 결핵균은 4가지의 항결핵 약제의 각 농도가 함유된 7H9 배양액에서 사멸하지 않고 생존하고 있음을 형광 현미경상에서 확인할 수 있었다. 프로피디움(propidium iodide)은 살아있는 세균의 경우 세포핵을 염색시키지 못하고

세포질만 염색함으로써 살아있는 결핵균은 형광 현미경 시야에서 녹색을 띄게 되고, 세포의 핵산을 염색시키는 Syto 9 은 사멸한 세포의 세포질을 통과하여 결핵 약제에 감수성인 결핵균의 세포핵을 염색시켜 형광 현미경 시야에서 붉은 색으로 관찰되었다.

결 론 :

Acridin (Syto9)과 propidium 성분을 이용하여 세포를 형광 염색시켜 세포의 사멸 및 생육을 판단하는 방법을 결핵균 약제감수성검사에 적용한 결과, 간편하고도 신속하게 24시간 이내에 내성균과 감수성균을 구분할 수 있었다. 생균과 사균 세포의 판별법으로 기존의 결핵균 감수성 방법을 대체하기 위해서는 형광현미경을 비롯한 실험실 장비와 숙련된 검사자가 필요하지만, 배양된 균으로 검사하는 데만 4주 이상 소요되는 기존의 결핵균 감수성 검사 방법을 대체할 수 있는 매우 저렴하고도 간편한 검사방법으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, Manheimer S, Merdard F, el-Sadr W, et al. Muotidrug-resistant tuberculosis in pateints without HIV infection. N Eng J Med 1995; 333(14):907-11.
2. Espinal MA, Laszlo a, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, et al., Global trends in resistance to antituberculosis drugs. N Eng J Med 2001;344:1294-303.
3. Espinal MA. The global situation of MDR-TB. Tuberculosis (Edinb). 2003;83(1-3):44-51.
4. Howard DH, Scott RD 2nd, Packard R, Jones D. The global impact of drug resistance. Clin Infect Dis. 2003;15:36(Suppl 1):S4-10.

5. Kim SJ. Current problems of drug-resistant tuberculosis and its control. *Kekkaku*. 2002; Nov;77(11):735-40.
6. Villanova, PA. Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Tentative standard M24-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995; NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards.
7. McClatchy JK. Susceptibility testing of mycobacteria. *Lab Med* 1978;9:47-52.
8. G.A. McFeters, A. Singh, S. Byun, P.R. Callis and S. Williams. Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*. 1991;13:87-97.
9. Zapata P, Arbeloa M, Aznar J. Evaluation of *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 227-230.
10. Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, Gitti Z, Nicolaou S, Petinaki E, Anagnostou S, Tselentis I, Maniatis AN. Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. *J Microbiol Methods*. 2004;Feb;56(2):291-4.
11. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL, Passen S. Characterization of the susceptibility of mycobacteria in BACTEC 12B media containing PANTA that had been supplemented with ceftazidime, and characterization of the individual components of PANTA in the presence of C(18)-carboxypropylbetaine. *J Microbiol Methods*. 2004;Feb; 56(2):243-51.
12. Fernandez M, Sanchez. Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *J. Microbiology* 2002;148:405-412.
13. Armstrong DW, He L. Determination of cell viability in single or mixed samples using capillary electrophoresis laser-induced fluorescence microfluidic systems. *Anal Chem* 2001;73:4551-4557.
14. Decker EM. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:188-192.