

객담 전처리 방법에 따른 객담 항산균 도말 및 배양 양성률 비교연구

¹국립마산병원, ²국제결핵연구센터

강형석¹, 성낙문¹, 이선숙¹, 김도형¹, 전두수^{1,2}, 황수희¹, 민진홍¹, 김진희¹, 원영섭¹, 박승규^{1,2}

Comparison of Smear and Culture Positivity using NaOH Method and NALC-NaOH Method for Sputum Treatment

Hyungseok Kang, M.D.¹, Nackmoon Sung, Ph.D.¹, Sunsook Lee¹, Dohyung Kim, M.D.¹, Doosoo Jeon, M.D.^{1,2}, Soohee Hwang, M.D.¹, Jinhong Min, M.D.¹, Jinhee Kim, M.D.¹, Youngsub Won, M.D.¹, Seungkyu Park, M.D.^{1,2}

¹National Masan Tuberculosis Hospital, ²International Tuberculosis Research Center, Masan, Korea

Background: Sputum decontamination with NALC-NaOH (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide) is known to better detect *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) by culture than that with using NaOH, which is widely used in Korean hospitals. In this report, sputum samples collected from pulmonary tuberculosis (TB) patients were treated with either NaOH or NALC-NaOH, and we compared the results of smear and culture positivity to determine whether the NALC-NaOH treatment method improves culture positivity in the sputum samples, and especially for those sputum samples that are smear negative and scanty.

Methods: For each decontamination method, 436 sputum samples from pulmonary TB patients in the National Masan Tuberculosis Hospital were collected for this study. Sputum from a patient was collected two times for the first and second day of sampling time, and these samples were employed for the decontamination process by performing the 4% NaOH and NALC-2% NaOH treatment methods, respectively, for detecting *M. tb* by an AFB (Acid Fast Bacilli) smear and also by culture in solid Ogawa medium.

Results: The NaOH and NALC-NaOH treatment methods did not significantly affect the AFB smear positivity of the sputum samples (33.0% vs 39.0%, respectively, $p=0.078$). However, the culture positive percents of *M. tb* in the Ogawa medium treated with NALC-NaOH and NaOH were 39.7% and 28.0%, respectively, which was a significantly different ($p=0.0003$). This difference in culture was more prominent in the sputum samples that were smear negative (the positive percents with NALC-NaOH and NaOH were 15.8% and 7.2%, respectively, $p=0.0017$) and scanty (NALC-NaOH and NaOH were 60.8% and 42.9%, respectively, $p=0.036$), but not for a smear that was 1+ or higher ($p>0.05$).

Conclusion: NALC-NaOH treatment is better than NaOH treatment for the detection of *M. tb* by culture, but not by smear, and especially when the AFB smear is negative and scanty. (*Tuberc Respir Dis* 2008;65:379-384)

Key Words: Tuberculosis, Decontamination

서론

객담 항산균 도말 및 배양검사는 폐결핵의 진단과 치료 경과의 관찰에 있어 필수적인 검사로 배양 양성을 보일 경우 확진이 가능하며 추후 약제내성 검사를 시행하여 내성여부에 따른 효과적인 치료약제를 결정하는 데에 매우

중요하다. 실제 임상에서 폐결핵이 의심되는 환자에서 객담 항산균 도말, 배양 혹은 모두에서 음성을 보일 경우 폐결핵의 진단이 용이하지 않아 항결핵제 치료시기가 지연되거나 불필요하게 항결핵제를 복용할 수 있다. 폐결핵으로 진단된 환자에 있어 객담 도말 혹은 배양 결과가 음성을 보이는 경우, 병변의 위치나 범위에 따라 객담의 양이 충분치 않거나 객담 내에 포함된 결핵균의 수가 적은 경우 혹은 환자가 적절한 객담 검체를 배출하지 못하는 경우와 같이 환자측의 원인들도 가능하나 검사실내의 인적, 검사기법적, 검사실 환경적 요소 등의 다양한 요인들이 검사결과에 영향을 미칠 수 있다.

결핵균 도말 및 배양을 위한 객담 전처리는 결핵의 세

Address for correspondence: Seungkyu Park, M.D.
National Masan Tuberculosis Hospital, 486, Gapo-dong,
Masan 631-710, Korea
Phone: 82-55-249-3901, Fax: 82-55-242-1135
E-mail: johnofkathy@yahoo.co.kr

Received: Oct. 16, 2008

Accepted: Nov. 17, 2008

균학적 진단을 위한 첫 단계이며 그 중 용해-오염제거 (digestion-decontamination) 과정은 선택된 방법에 따라 검사 결과에 직접 영향을 미칠 수 있는 중요한 과정이다. Sodium hydroxide (NaOH) 기법과 N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) 기법은 가장 많이 사용되는 용해-오염제거 기법으로 NALC-NaOH 기법이 보다 나은 배양 양성률을 보이는 것으로 알려져 있으나¹, Chang 등²의 조사에 의하면 국내에서는 79%의 임상 미생물 검사실이 NaOH 기법을 사용하는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 NaOH와 NALC-NaOH 전처리 방법을 이용하여 객담의 도말 및 배양 양성률 그리고 배지 오염률을 비교하고자 하였으며, 특히 객담 도말 검사 상 음성과 scanty 혹은 관찰된 항산균의 실 개체수(exact figure)로 관독된, 결핵균의 수가 적을 것으로 예상되는 객담에서 배양 결과의 차이를 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 객담 검체

2007년 6월부터 2008년 6월까지 국립마산병원에서 통상적인 진료 과정의 한 부분으로, 폐결핵의 진단이나 치료 경과 관찰을 위하여 채집된 객담을 이용하여 전향적으로 연구하였다. 환자에게 객담배출 요령을 충분히 교육한 후 두 개의 객담 검체를 2일간 매일 1회씩 2회 채취하였으며 객담의 양이 3 ml 미만이거나 비결핵성 항산균 폐결핵 환자 그리고 비결핵성 항산균이 배양된 객담은 제외하였다. 이 연구에서는 각각의 전처리 방법에 436개의 객담 검체가 이용되었다(n=436).

2. 객담 전처리

한명의 환자에게서 채취된 2개의 객담 검체 가운데 하나는 통상적으로 본원에서 시행되었던 NaOH 기법으로, 다른 하나는 NALC-NaOH 기법을 적용하여 용해-오염제거 과정을 거친 후 도말과 배양 검사를 진행하였다. 각각의 전처리 방법은 아래와 같다¹.

3. NaOH 기법

객담과 동일한 양의 4% NaOH를 혼합하고 충분히 혼든 뒤 상온에 15분간 거치 후 15분간 3,000 x g로 원심 분리한다. 원심분리액의 침전물에 인산완충용액(Phosphate Buffer Solution, PBS; pH 7.0) 1 ml을 혼합하여 중화시킨 후 도말 및 배양 접종한다.

4. NALC-NaOH 기법

객담과 동일한 양의 NALC-NaOH 용액(0.5% NALC, 2% NaOH, 1.45% sodium citrate)과 혼합하고 충분히 용해될 때까지 기다린 뒤 상온에 15분간 거치시키고 15분간 3,000 x g로 다시 원심 분리한다. 원심분리액의 침전물을 1 ml의 PBS와 혼합한 후 도말 및 배양 접종한다.

5. 판독과 결과보고

객담 도말 검사는 Ziehl-Neelson 염색법으로, 배양은 Ogawa 고체배지에 시행하였으며 배양 양성 균주는 PCR 기법(Bioseum[®], Seoul, Korea)으로 결핵균임을 확인하였다. 모든 검사는 한 명의 검사자에 의해 수행되었고 국제 보건기구(WHO)에서 권고한 방법^{3,4}에 따라 도말의 판독은 1,000배 광학현미경 검경하에 100시아 검사상 항산균이 관찰되지 않을 경우 음성, 1~9 개체가 관찰될 경우 scanty, 10~99 개체가 관찰될 경우 1+, 1 시야 당 1~10 개체가 관찰될 경우 2+, 1 시야 당 10 개체를 초과 할 경우 3+로 결과 보고하였다. 배양의 판독은 scanty (1~19 집락균이 관찰된 경우 관찰된 집락균 수를 기재), 1+ (20~100 집락균이 관찰된 경우), 2+ (100~200 집락균이 관찰된 경우), 3+ (200~500 집락균이 관찰된 경우), 4+ (500 집락균을 초과하여 관찰된 경우), 오염 등으로 보고하였다. 도말과 배양 검사에서 scanty의 기준에 해당하는 경우 WHO 권고는 관찰된 실제 개체수나 실제 집락균 수를 보고하도록 되어 있으나 편의상 scanty로 보고하였고, 배양상 3+와 4+는 3+로 통합하여 처리하였다.

6. 통계분석

수집된 자료는 GraphPad InStat[®] version 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 통계처리 하였고 처리방법에 따른 객담 도말 및 배양의 양성률의 비교는 Chi-square test로 통계적 유의성을 검정하였으며 p값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있다고 판정하였다(p<0.05).

결 과

항산균 도말 검사에서는 NaOH 기법에 비하여 NALC-NaOH 기법이 다소 높은 양성률(33.0% vs. 39.0%)을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(p=0.078, Figure 1). 결핵균 배양 검사에서는 평균 배양 양성 판정일은 NaOH

기법과 NALC-NaOH 기법에서 각각 35.6일과 37.5일, 배지 오염률(culture contamination)은 각각 3.2%와 3.0%로 유의한 차이를 보이지 않았다. 배양 양성률은 NALC-NaOH 기법이 통계적으로 유의하게 높은 배양 양성률(39.7% vs. 28.0%, $p=0.0003$)을 보였으며(Figure 1), 배양 결과를 도말 검사 결과와 연관 지어 분석하였을 때 도말 1+ 이상의 결과를 보여준 객담에서는 서로 유사한 객담 배양 양성률을 보인 반면 도말 검사상 음성인 경우 NaOH

기법과 NALC-NaOH 기법은 각각 7.2%와 15.8% ($p=0.0017$), scanty를 보인 객담의 경우 각각 42.9%와 60.8% ($p=0.036$)의 배양 양성률을 보여 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다(Table 1, 2, Figure 2).

고 찰

본 연구에서 객담의 전처리 과정에 사용된 NALC-NaOH 기법이 NaOH 기법에 비하여 높은 배양 양성률을 보였으며 이는 도말 검사 상 음성이나 scanty를 보여 상대적으로 결핵균의 수가 적을 것으로 생각되는 객담 검체에서 배양 양성률의 차이가 두드러짐을 알 수 있었다.

결핵균은 다른 병원균들과 달리 강한 응집성, 코드(cord) 형성, 부유성, 두꺼운 세포벽으로 인한 표면장력, 그리고 상대적으로 느린 성장 속도 등과 함께 진단용 검체에 비교적 적은 개체수가 포함되어있다는 특징이 있으므로 폐결핵 환자의 진단을 위해 객담 검체가 채취된 다음 도말이나 배양 검사를 위한 배지 접종 전에 원심분리를 이용한 농축과정과 결핵균에 비해 상대적으로 성장속도가 빠른 호흡기내의 상재균 및 타 병원균을 제거하기 위한 용해-오염제거 전처리 과정을 거치게 된다⁵. 이러한 전처리 과정은 보다 효율적으로 결핵균을 분리하고자 하는 목적으로 시행되지만 오히려 결핵균을 사멸시키게 되는 역효과도 피할 수 없다^{6,7}. 이 가운데 용해-오염제거를 위한

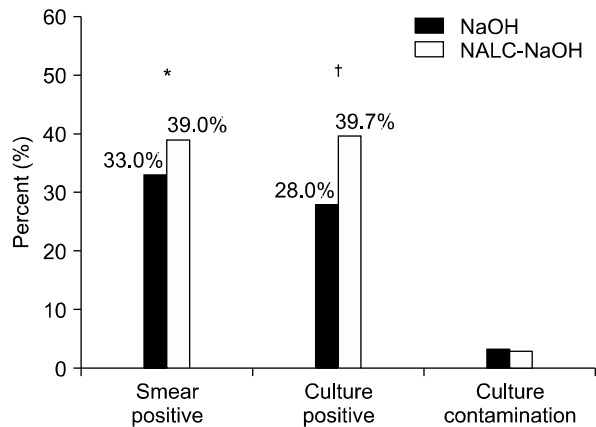


Figure 1. Smear and culture positivity of sputum samples treated with NaOH and NALC-NaOH method. NaOH: sodium hydroxide; NALC-NaOH: N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide. * $p=0.078$, † $p=0.0003$.

Table 1. 4% NaOH method-comparison between smear and Ogawa media culture

	Culture (n=436)							Total
	Negative	Positive					Contamination	
		Total	Scanty	+	++	+++		
Negative (n=292)	262 (89.7%)	21 (7.2%)	9 (3.1%)	10 (3.4%)	2 (0.7%)	-	9 (3.1%)	292 (100%)
Scanty (n=56)	30 (53.5%)	24 (42.9%)	5 (8.9%)	16 (28.5%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	2 (3.6%)	56 (100%)
Smear (n=436)								
+	8 (10.6%)	65 (86.7%)	7 (9.3%)	22 (29.3%)	22 (29.3%)	14 (18.7%)	2 (2.7%)	75 (100%)
++	-	10 (90.9%)	-	1 (9.1%)	2 (18.1%)	7 (63.6%)	1 (9.1%)	11 (100%)
+++	-	2 (100%)	-	1 (50%)	-	1 (50%)	-	2 (100%)
Total	300 (68.8%)	122 (28.0%)	21	50	28	23	14 (3.2%)	436 (100%)

NaOH: sodium hydroxide.

Table 2. NALC-NaOH method-comparison between smear and Ogawa media culture

		Culture (n=436)						Total	
		Negative	Positive						
			Total	Scanty	+	++	+++		
Smear (n=436)	Negative (n=266)	220 (82.7%)	42 (15.8%)	8 (3.0%)	33 (12.4%)	-	1 (0.4%)	4 (1.5%)	266 (100%)
	Scanty (n=69)	24 (34.9%)	42 (60.8%)	12 (17.4%)	23 (33.3%)	7 (10.1%)	-	3 (4.3%)	69 (100%)
	+	6 (6.8%)	77 (87.5%)	10 (11.4%)	32 (36.4%)	23 (26.1%)	12 (13.6%)	5 (5.7%)	88 (100%)
	++ (n=12)	-	11 (91.7%)	-	-	1 (8.3%)	10 (83.3%)	1 (8.3%)	12 (100%)
	+++ (n=1)	-	1 (100%)	-	-	-	1 (100%)	-	1 (100%)
	Total	250 (57.3%)	173 (39.7%)	30	88	31	24	13 (3.0%)	436 (100%)

NALC-NaOH: N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide.

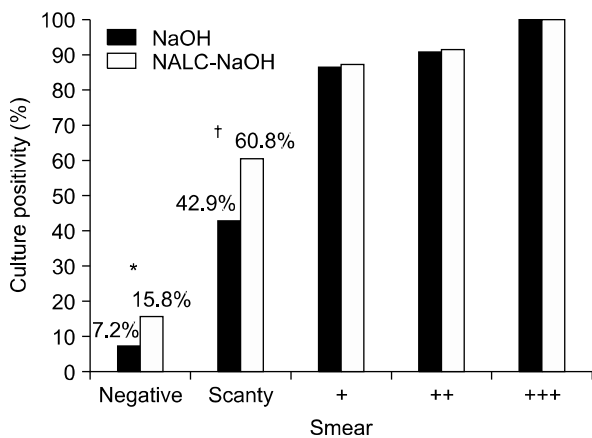


Figure 2. Comparison of culture positivity between two methods in each smear grade. NaOH: sodium hydroxide; NALC-NaOH: N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide. *p=0.0017, †p=0.036.

기법으로 본 연구에서 시행된 NaOH 기법과 NALC-NaOH 기법 이외에도 Zephiran-Trisodium Phosphate (Z-TSP) 기법, Oxalic acid 기법 그리고 Sulphuric acid 기법 등이 있으며 오염제거 과정에 참가되었던 NaOH를 중화시키기 위해 생리 식염수나 PBS를 혼합하는 중화과정이 오염제거 과정에 포함된다. Z-TSP 기법은 benzal konium chloride (zephiran)과 trisodium phospahte을 오염제거에 사용하며 약 30%의 결핵균 사멸률이 예측되고 NaOH 기법

보다도 각 단계별 처리시간을 엄격하게 지키지 않아도 되는 장점에 반해 객담 처리 시간이 긴 단점을 가지고 있다. Oxalic acid 기법은 녹농균에 의한 오염이 심한 경우에 사용되며 알칼리 전처리 후 반복적인 오염을 보이는 소변과 같은 검체의 경우 Sulphuric acid 기법을 이용하게 된다. 장기간의 객담 보관이나 운송이 예상될 경우 Cetylpyridinium chloride 처리 기법⁸이 사용되는 등 각각의 전처리 방법은 결핵균의 사멸정도, 소요시간, 소요비용, 대상 검체, 주된 오염균 그리고 개별 실험실의 설비와 숙련도 등에 따라 선택적으로 사용될 수 있다. 오염제거 과정에서 주된 문제점은 NaOH에 의해 오염균뿐만 아니라 결핵균도 일부 사멸되므로 오염제거에 치중할 경우 도말 및 배양 검사의 감수성에 영향을 미칠 수 있다는 것이다. 개별 전처리 방법에 따른 장단점과 차이에 대한 연구는 주로 1960~70년대에 이루어졌으며, 특히 객담전처리 방법에 있어 NaOH의 농도, 원심분리, 원심분리의 효율에 따른 객담 내 결핵균의 사멸률을 살펴 본 과거의 연구^{9,10}에 의하면 4% NaOH를 사용할 경우 객담 전처리 과정에서 60~70%의 결핵균이 사멸되며 이에 비해 NALC-NaOH 기법은 acetyl cystein을 추가함으로써 객담의 용해를 돕고 상대적으로 NaOH의 농도가 낮아짐에 따라 결핵균 사멸률을 30%로 감소시킬 수 있어 배양 양성률을 높일 수 있는 방법으로 여겨져 왔다¹. 또한 첨가된 acetyl cystein은 함께 첨가된 sodium citrate에 의해 쉽게 중화되고 액화된

객담에서는 쉽게 불활성화되어 객담 검사에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 하지만 acetyl cystein이라는 첨가물이 추가되어야 하고(경우에 따라 0.2%의 bovine albumin이 전처리 과정에 이용되기도 한다) NaOH 기법에 비해 각 단계별 처리시간을 엄격히 지켜야 하며 배양을 위한 접종 시 희석과정이 추가되어야 하는 등의 단점을 가지고 있다^{1,4,11}.

결핵은 그 질환의 특성상 국가 결핵 관리 프로그램의 한 부분으로서 진단 및 치료 지침의 표준화와 함께 검사기법에 있어서 보급의 용이성이 담보되어야 하므로 국제보건기구 등에서 주된 결핵관리의 대상이 되는 저개발국가에서는 NaOH 기법이 주로 권장되고 이용된다. 대한 임상 미생물학회에서 국내 임상 검사 기관을 대상으로 실시한 2001년 조사에 의하면 설문응답을 한 64개 기관 중에서 13개 기관만이 NALC-NaOH 기법을 사용하고 있는 것으로 나타나² 임상적인 목적으로 객담 항산균 도말 및 배양 검사가 시행되는 많은 수의 실험실에서 객담 전처리 과정은 과거에 NaOH 기법이 도입된 후 큰 변화 없이 현재까지 사용되고 있는 것으로 보인다. 객담 전처리에 대한 비교적 최근 국내외의 연구 결과들을 살펴보았을 때 종래의 NALC-NaOH 기법과 비슷한 수준의 도말 혹은 배양 양성률을 보이되 물적, 인적자원이 제한된 곳에서도 보다 간단하고 경제적인 기법을 고안하고자 하는 시도와 보다 높은 민감도와 특이도를 보이면서 이미 임상적인 진단과 치료 경과 모니터링에 널리 이용되고 있는 액체 배양 및 분자생물학적 진단 기법 그리고 임상적인 중요성이 대두되고 있는 비결핵성 항산균의 배양과 동정에도 효율적으로 적용될 수 있는 기법을 고안하고자 하는 시도로 크게 구분되어질 수 있다. 국내에서는 Jeong 등¹²이 객담 전처리 시 중화와 원심분리 침전 과정의 추가가 도말 결과에 영향을 주지 않으면서 배양 양성률을 높일 수 있음을 보인 바 있으나 객담 전처리와 관련된 연구는 그리 많지 않다. Ganoza 등¹³은 고장성 생리식염수를 이용하는 hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) 기법이 간단하고 낮은 비용으로 NALC-NaOH 기법에 준하는 도말 및 배양 양성 결과를 보여 국가결핵관리에 이용될 수 있음을 제안하였다. 이에 비하여 Chakravorty 등¹⁴은 4 to 6 M guanidinium hydrochloride, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 25 mM EDTA, 0.5% Sarkosyl 그리고 0.1 to 0.2 M-mercaptoethanol의 성분을 포함하는 용액으로 전처리(universal sample processing, USP) 했을 경우 도말, 배양, PCR 기법에서 보다 우수한 민감도와 특이도를 보인다고 보고하였고, C18-

Carboxypropylbetaine을 객담 전처리에 이용한 Thornton 등^{15,16}의 연구에서는 도말과 고체배지를 이용한 배양에서 종전의 NALC-NaOH 기법과 비교하여 우수한 결과를 보여준 바 있다.

본 연구는 본원의 결핵 진단기법 개선 및 개발과정의 일환으로 시행되었으며 NALC-NAOH를 이용한 객담 전처리 과정의 양성률 개선을 확인하여 본원에 적용코자 시작되었다. 보여진 바와 같이 NaOH 기법과 NALC-NaOH 기법이 객담과 혼합 후 최종 NaOH의 농도가 약 2%와 1%로 차이를 보임에도 불구하고 배지 오염률은 유사하게 나타났으며, 도말 검사에서 음성이나 scanty를 보여 상대적으로 결핵균의 수가 적은 객담의 경우 NALC-NaOH를 이용함으로써 배양 양성률을 개선시킬 수 있음을 보여주었다. 이는 임상적으로 폐결핵의 진단이나 결핵 환자의 치료경과 관찰에 직접적인 도움이 될 수 있으리라 보이며 국가결핵 관리 측면에서 보다 많은 시험 기관에서 NALC-NaOH 기법의 도입이 필요할 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 점성이 높은 객담을 기계적으로 양분하기 불가능하여 종전에 발표된 연구들처럼 동일한 객담을 양분하지 않고 다른 시기에 배출된 객담을 무작위 배정 후 이용하여 객담 배출 상황에 따른 변수를 배제할 수 없었다.

추후 새로운 용해-오염제거법의 시도와 함께 도말, 고체배양, 액체배양 및 PCR을 포함한 분자생물학적 진단방법에 있어서도 여러 가지 전처리 방법에 따른 결과를 분석하여 가장 적절한 기법을 찾아내고자 하는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: NaOH (sodium hydroxide) 기법을 이용한 전처리 객담과 NALC-NaOH (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide) 기법을 이용한 객담의 항산균 도말 및 결핵균 배양 양성률 그리고 배지 오염률을 비교하여 실험실 검사 과정 중의 일부분을 개선함으로써 검사 결과의 개선이 가능한 지 확인하고자 하였다.

방 법: 2007년 6월부터 2008년 6월까지 국립마산병원에서 객담 검사가 시행된 환자를 대상으로 환자에게서 객담배출 요령을 충분히 교육한 후 두개의 객담 검체를 채취하여 통상적인 NaOH 기법과 NALC-NaOH 기법을 각각 적용한 후 도말 및 배양 결과 그리고 배지 오염률을 비교하였다(n=436).

결 과: 항산균 도말 검사에서는 NaOH 기법에 비하여

NALC-NaOH 기법이 다소 높은 양성률(33.0% vs. 39.0%)을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다($p=0.078$). 결핵균 배양 검사에서는 배지 오염률(culture contamination)은 각각 3.2%와 3.0%로 유의한 차이는 보이지 않았다. 배양 양성률은 NALC-NaOH 기법이 통계적으로 유의하게 높은 배양 양성률(39.7% vs. 28.0%, $p=0.0003$)을 보였으며, 배양 결과를 도말 검사 결과와 연관 지어 분석하였을 때 도말 검사상 음성인 경우 NaOH 기법과 NALC-NaOH 기법은 각각 7.2%와 15.8% ($p=0.0017$), scanty를 보인 객담의 경우 각각 42.9%와 60.8% ($p=0.036$)의 배양 양성률을 보여 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다.

결론: 도말 검사에서 음성이거나 scanty를 보여 상대적으로 결핵균의 수가 적은 객담의 경우 NALC-NaOH를 이용함으로써 배양 양성률을 개선시킬 수 있었으며 이는 임상적으로 폐결핵의 진단과 치료 경과 관찰에 직접적인 도움을 줄 수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구에서 객담 채집에 도움을 주신 국립마산병원 간호과 여러분들께 감사 드립니다.

참고 문헌

1. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: guide for the Level III Laboratory. 2nd ed. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
2. Chang CL, Park TS, Kim MN, Lee NY, Lee HJ, Suh JT. Survey on changes in mycobacterial testing practices in Korean laboratories. Korean J Clin Microbiol 2001;4: 108-14.
3. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II. Microscopy. Geneva: World Health Organization; 1998.
4. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III. Culture. Geneva: World Health Organization; 1998.
5. Scott CP, Dos Anjos Filho L, De Queiroz Mello FC, Thornton CG, Bishai WR, Fonseca LS, et al. Comparison of C(18)-carboxypropylbetaine and standard N-acetyl-L-cysteine-NaOH processing of respiratory

- specimens for increasing tuberculosis smear sensitivity in Brazil. J Clin Microbiol 2002;40:3219-22.
6. Yegian D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952;22:456-60.
7. Ratnam S, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. J Clin Microbiol 1986;23:582-5.
8. Smithwick RW, Stratigos CB, David HL. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1975;1:411-3.
9. Tacquet A, Tison F, Devulder B, Roos P. Techniques for decontamination of pathological specimens for culturing mycobacteria. Bull Int Union Tuberc 1967;39:21-4.
10. Beam RE, Kim KS, Kubica GP. Comparison of different digestion-decontamination methods for recovery of mycobacteria from sputum: a suggested method for "field processing" of sputa. Scand J Respir Dis 1967;48:136-41.
11. Sula L. Comparative trials with different decontaminating agents for growing Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens. Bull World Health Organ 1968;39:647-55.
12. Jeong J, Chang CL. Evaluation of mycobacterial recovery by specimen preparation and inoculating media. Korean J Clin Pathol 2000;20:188-93.
13. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J, Rojas G, Munayco C, Agapito J, et al. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for Mycobacterium tuberculosis microscopy and culture. J Med Microbiol 2008; 57:1094-8.
14. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2005;43:2703-8.
15. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Lockwood DE, Romagnoli M, Turner J, et al. Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C18-carboxypropylbetaine: blinded study. J Clin Microbiol 1998;36:1996-2003.
16. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Wolfe DM, Llorin OJ, Passen S. Processing respiratory specimens with C18-carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. J Clin Microbiol 1998;36:2004-13.