

The Rapid Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by GenoType[®] MTBDRplus in Contaminated Specimen

Reun Heo¹ and Yoon-Sik Kim^{2,†}

¹Department of Laboratory Medicine, Korean National Tuberculosis Association, Gwangju 500-812, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea

There are several methods currently being used to diagnose tuberculosis in patients, such as smear, PCR, tuberculosis culture and X-ray. For a proper medical treatment, antimicrobial susceptibility test and rapid drug susceptibility testing have been operated. Tuberculosis bacilli usually need 3~8 weeks of culture period because of delay in RNA synthesis and require 15~22 hours for generation. After a germ raises in culture, we initiated 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 practicing drug susceptibility testing which allow us to know the sensibility of RMP and INH after 2 or 3 days. But this is only possible when more than 2 positive germ. Therefore, we should practice rapid drug susceptibility testing with culture test. But if media is contaminated 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 address these problems and quick patient treatment, rapid drug susceptibility testing is practiced by using GenoType[®] MTDRplus method. As a result of this method we detected sensibility 10 and 7 cases and resistance 0 and 3 cases using RIM and INH respectively with other 1 case toward medicals out of the total 11 test. In conclusion rapid drug susceptibility testing can be used from the contaminated specimen after elimination of contaminated source from culture and proved that it can be practiced for rapid examination of a tuberculosis patient.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, GenoType[®] MTBDRplus, Antimicrobial susceptibility test

서 론

결핵균 중 사람에게 결핵을 일으키는 원인균을 1882년 Robert Koch에 의해서 분리 동정되었으며, 1896년 Lehmann와 Neumann에 의해 *Mycobacterium tuberculosis*라 명명되었고 현재는 유전자염기서열까지 완전하게 해독되었다 (Cole et al., 1998; Arnvig and Young, 2009). 결핵균은

그램 양성으로 항산성 (acid fast) 염색성을 나타낸다. 인공 배지 상에서 발육한 결핵균을 보면 분열증식한 균들이 서로 엉켜 붙어 균덩어리가 마치 뱀처럼 보인다 (Toman, 1979). 형태적으로도 20 nm 두께의 세포벽에는 60% 이상이 미콜산과 같은 독특한 지방산이 주축이 되는 지방화합물을 함유하고 있어 염료가 잘 침투하지 않아 석탄산과 같은 매염제를 첨가해 주어야 염료가 지방에 용해되어 균세포 내로 확산되어 염색이 된다. 균세포 내로 침투한 염료는 산성알콜과 같은 강한 탈색제로 처리해도 탈색되지 않고 남게 되기 때문에 항산성 염색성이라 한다 (Barksdale and Kim, 1977). 굵기는 0.2~0.5 μm , 길이가 2~5 μm 정도 되는 막대 균으로 운동성도 없고 내생 또는 외생포자도 생산하지 않는다 (Grange, 1992).

결핵의 진단방법으로는 도말검사, 임상가검물과 파라인

*Received: December 10, 2013 / Revised: December 23, 2013

Accepted: December 26, 2013

†Corresponding author: Yoon Sik Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea.

Tel: +82-62-520-2302, Fax: +82-62-520-2525

e-mail: kys2982@naver.com

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

포매조직을 이용한 PCR 검사, 균배양검사, X-ray 촬영 등으로 폐결핵의 진단과 치료경과를 관찰하고 있으며 적절한 치료를 위해서는 약제감수성검사 등을 통해 환자에서 검출된 균의 약제 내성 여부를 판단하여 적절한 처방으로 환자를 치료하는데 사용된다 (Kim et al., 2000; Imperiale et al., 2012). 도말검사는 비용이 저렴하고 검사 결과를 신속하게 얻을 수 있다. 그러나 광학현미경으로 1,000배율 300시야 정도를 검경하였을 때 3~9개의 균이 있어야 양성으로 보고를 낼 수 있는데 최소한 객담 1 ml에 1~3만개 이상의 균이 있어야 현미경 관찰이 가능하기 때문에 민감도는 배양검사보다 떨어지는 단점이 있다 (Groothuis and Yates, 1991). 배양검사는 균을 검출할 수 있는 민감도가 도말검사에 비해 훨씬 높아 객담 1 ml에 발육 가능한 균이 10개만 있어도 검출된다. 그리고 균을 분리배양해야 정확한 균종을 동정할 수 있고 각종 항결핵제에 대한 감수성검사도 실시할 수 있기 때문에 매우 중요한 검사방법이다. 그러나 결핵균의 세대증식 시간이 15~22시간이라는 특성상 검사 결과를 얻기까지 3~8주 정도의 시간이 걸리고 검사조작과정이 복잡하고 어려워 숙련된 검사자에 의해서만 수행되고 있으며 많은 기자재를 필요로 하는 단점이 있다 (Jin et al., 1989). 이러한 문제점을 보완한 방법으로 DNA 중합효소연쇄반응검사법인 PCR 검사법이 쓰이고 있다 (Mullis and Faloona, 1987). PCR 검사법은 결핵균처럼 분리배양에 오랜 시간이 걸리는 병원균의 검출에 매우 유용하다 (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1992). 약제감수성검사는 환자 치료에 적절한 약제를 처방하는데 매우 유용하며 특히 초기 치료에 실패한 환자에 대해서는 감수성검사 결과가 유용한 재 치료 처방 선정에 도움이 된다. 일반적인 방법으로는 절대농도법, 내성비율법, 내성비율법 등이 있으나 대부분의 검사실이 절대농도법과 내성비율법을 이용한다 (Padungchan et al., 1986). 그러나 약제감수성검사는 4주 정도의 시간이 걸린다는 단점이 있다. 신속감수성검사법은 약제감수성검사의 검사 결과 동정까지 시간이 오래 걸린다는 단점을 보완하고 적절한 처방을 위해 매우 유용하게 사용되어지고 있으며 최근 2가지 이상의 약제에 내성이 있는 다제내성 결핵이 증가하여 문제화되면서 좀 더 빨리 약제감수성검사 결과를 얻고자 하는 필요성 대두되었다 (Jeon et al., 2008). 결핵의 1차 치료약제 중 대표적인 리팜피신 (rifampicin, RMP)과 아이나 (isoniazid, INH)에 대한 내성은 다제내성의 보조지표로 이용되고 있기 때문에 현재 이 두 약제에 대한 내성 여부를 2~3일 안에 신속하게 확

인할 수 있는 검사법이 결핵환자의 치료에 효과적으로 사용되어지고 있다 (Vijdea et al., 2008; Lei et al., 2010). 그러나 소량의 균으로는 검사가 불가능하기 때문에 배양검사를 실시한 후 신속감수성검사를 실시하게 된다. 그러나 배양 중에 배지가 결핵균 이외의 다른 세균에 의해 오염이 된 경우는 배양검사에 대한 결과 판독과 약제감수성 검사 및 신속감수성검사를 실시 할 수 없게 된다. 그러면 처음부터 환자로 검체를 다시 채취하여 도말, 배양검사를 재 실시하게 되므로 인해 시간이 많이 소요되어 그 만큼 적절한 환자 치료가 지연되게 된다.

본 연구에서는 배양 시 발생하는 오염에 대한 문제점을 보완하여 다제내성 결핵환자의 확산 방지와 신속한 환자 치료를 위해 도말검사 양성 검체 중에서 배양 기간 중에 오염이 된 검체에서도 신속감수성검사가 가능한지를 알아보기 위한 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

검체

2% Ogawa 배지에 배양한 검체 총 18,241건 중 결핵균 양성 396 (2.17%)건, 음성 17,485 (95.85%)건, 오염 173 (0.95%)건, 비결핵 항산균 (nontuberculous mycobacteria, NTM) 187 (1.02%) 건으로 나타났다. 실험에 이용된 검체는 배양 시 오염이 발생된 173건 검체 중 도말검사 양성 이 나온 13건에 대해 재 채담 의뢰해 재 채담한 결과 도말검사 음성 1건, 양성 11건, 미의뢰 1건 등을 보였다. 재 채담한 도말검사 상 양성으로 나온 검체의 오염검체 11건을 연구검체로 이용하였다.

도말검사와 배양

도말검사는 형광염색시약인 Auramine-Rhodamine으로 염색하였고, 탈색액으로는 1% HCL-alcohol을 사용하였으며, 대조염색액으로 0.2% 과망간산칼륨 (KMnO₄) 수용액을 사용하였다. 배양용으로 멸균된 담통에 받은 객담에 4% NaOH를 동량을 가한 다음 2% Ogawa 배지 2분에 0.1 ml씩 접종하여 발육 유무를 관찰하였다.

오염원 제거

2% Ogawa 배지에서 오염원이 발견된 즉시 4% NaOH와 2.9% 구연산나트륨을 동량으로 첨가하여 소화시켜 균 질화한 용액 100 ml당 0.5 g N-Acetyl-L-Cysteine (NALC)-NaOH 분말을 첨가하였다. 모아진 검체를 50 ml 원심분리

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

시험관에 분주한 다음 검체와 동일한 양으로 NALC 용액을 첨가하여 혼합하였다. 1,000 ×g의 속도로 15분 동안 원심분리하여 검체를 농축한 다음 조심스럽게 상청액을 제거하고 최종양이 1~3 ml이 되기까지 멸균된 피펫을 사용하여 PBS (pH 6.8)로 침전물을 재 부유하여 이용하였다.

DNA 추출

채취한 검체를 멸균된 증류수 300 µl에 재 부유한 다음 부유한 박테리아를 vortex로 잘 혼합하여 100℃에서 20분간 가열하여 비활성화시킨 다음 60℃에서 15분 동안 초음파 처리하였다. 10,000 ×g로 5분 동안 원심·분리하여

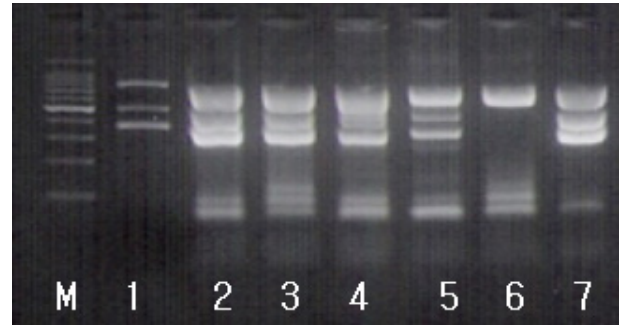


Fig. 1. Multiplex-PCR. M: 100 bp ladder (Seegene Cat. No. M0100), 1: Internal control, 2~5: *Mycobacterium tuberculosis*, 6: *Mycobacteria*, 7: *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

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

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

상층액을 PCR 반응에 사용하였다.

신속감수성검사

신속감수성검사에는 GenoType® MTBDRplus kit (Hain Lifescience GmbH, Hehren, Germany)를 이용하여 분석하였다. GenoType® MTBDRplus법은 DNA·STRIP® 기술을 기초로 하여 검체 1개 당 PNM, 10x PCR Buffer, 25 mM MgCl₂, 1 U Host StarTaq, 멸균된 증류수를 혼합한 PCR 마스터 혼합액 45.2 µl에 DNA 추출액 5 µl과 혼합하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex-PCR)을 실시한 후 인형결핵균과 비인형결핵균으로 판정하였다 (Fig. 1). 인형결핵균으로 판정된 다중중합효소연쇄반응 증폭산물은 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 탐침자가 접합된 스트립에 역 교잡시켜 리팜피신과 아이나 내성을 동시에 진단하였다 (Table 1, 2, 3). 인형결핵균으로 판정

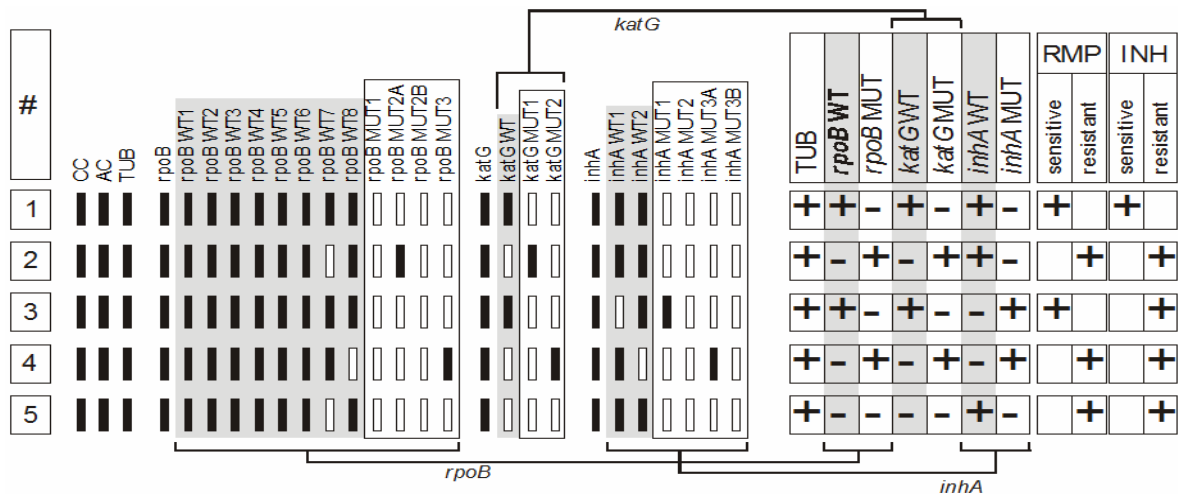


Fig. 2. GenoType[®] MTBDRplus an analysis table. Representative patterns obtained by the GenoType[®] MTBDRplus test for isolates with dual mutations in the *rpoB* gene based on sequencing. The positions of the oligonucleotides and the marker lines are given. The targeted genes and specificity are shown from left to right, as for the MTBDR assay, conjugate control (CC); amplification control (AC); *M. tuberculosis* complex-specific control (TUB).

Table 4. Results from polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction	
Positive	Negative Doubt (NTM)
11	2

PCR analysis were determined as described in materials and methods.

검체를 GenoType[®] TBDRplus법을 이용하여 교잡과정을 거쳐 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 탐침자가 접합된 스트립에 역 교잡시켜 리팜피신과 아이이나에 대한 내성검사를 실시한 뒤 GenoType[®] MTBDRplus 결과 분석표 및 판정지를 참조하여 결과를 분석하였다 (Fig. 2, 3).

결 과

오염된 검체의 DNA중합효소연쇄반응검사 (PCR)

도말검사 양성 중 배양검사 오염으로 판정되어진 검체를 인형결핵균인지 비결핵항산균인지를 감별하기 위해 오염원을 제거하고 검체 1개 당 PCR 마스터 혼합액을 조제한 다음 모든 PCR 시험관에 PCR 마스터 혼합액 45 µl씩을 분주하고 추출된 DNA 5 µl씩을 각각의 PCR 시험관에 분주한 후 PCR 반응을 시켜 실시한 결과 총 13건 중 인형결핵균 11건, 음성 (비결핵항산균 의심) 2건의

Table 5. Results of rapid drug susceptibility testing

Rapid drug susceptibility test			
	Sensibility	Resistance	Other
RMP	10	0	1 (ill defined)
INH	7	3	

결과를 얻을 수 있었다 (Table 4).

신속감수성검사

신속감수성검사는 배양검사 오염으로 판정된 검체를 오염원을 제거하고, PCR 검사를 통해 인형결핵균으로 판정된 11검체를 GenoType[®] MTBDRplus법을 이용 분석한 결과는 CC, AC, TUB, Locus Control은 모두 양성일 때 나머지 밴드로 결과를 판독하고 AC 음성일 경우는 PCR 단계가 잘못되었거나 PCR 저해제의 영향을 받았을 가능성이 있으므로 재시험을 수행하였다. *rpoB*는 모든 WT가 양성이고 MUT가 음성이면 리팜피신 감수성으로, WT가 음성이고 MUT가 양성인 경우와 WT가 음성이고 MUT가 음성이면 리팜피신 내성으로 판정하였다. *katG*는 모든 WT가 양성이고 MUT가 음성이면 아이이나 감수성으로, WT가 음성이고 MUT가 양성인 경우와 WT가 음성이고 MUT가 음성이면 아이이나 내성으로 판정하였다. *inhA*는 모든 WT가 양성이고 MUT가 음성이면 아이이나 감수성, WT가 음성이고 MUT가 양성인 경우와 WT가 음성인 경우와 MUT가 음성이면 아이이나 내

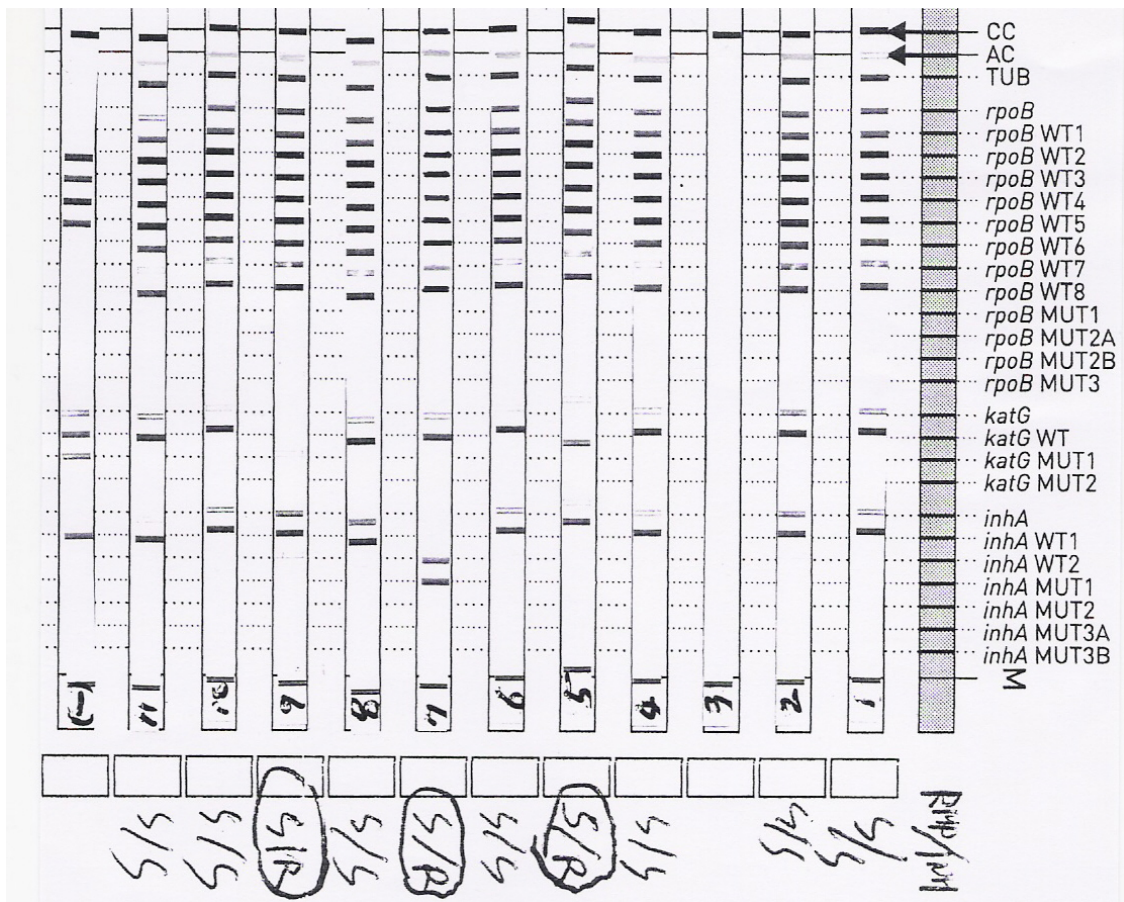


Fig. 3. Rapid drug susceptibility test a result table. RMP/INH: 1 S/S, 2 S/S, 3 nontuberculous mycobacteria, 4 S/S, 5 S/R, 6 S/S, 7 S/R, 8 S/S, 9 S/R, 10 S/S, 11 S/S, 12 Negative control. sensibility (S); resistance (R).

성으로 판정하였다 (Fig. 3). 이러한 결과를 기준으로 검사한 결과 검체 11건 중 리팜피신 내성은 0건, 감수성은 10건, 아이나 내성은 3건, 감수성은 7건, 원인불명 1건의 결과를 얻었다 (Table 5).

신속감수성검사 결과 보고 일까지 첫 번째 채담검체와 재 채담검체와의 소요 일 수 비교

검체 중에 도말검사 결과 양성으로 배양검사 오염으로 판정된 경우 해당 검체에 대해 재 의뢰 요구를 하여 재 의뢰된 검체를 다시 도말검사와 배양검사 그리고 신속감수성검사를 실시하는데 걸리는 소요 일 수와 처음 의뢰되었던 검체가 배양검사에서 오염이 되었다 하더라도 오염원을 제거하고 신속감수성검사를 실시하여 검사 결과를 보고하기까지의 소요 일 수를 비교 분석한 결과 대부분의 검체의 오염확인은 배양 후 평균 11.8일째 발생하였으며, 재 채담하여 검체의 결과를 분석하기까지 지체된

평균 시간은 12.2일이 더 소요됨을 알 수 있었다 (Table 6).

고 찰

대한결핵협회 자료를 보면 우리나라는 1965년 실태조사 때는 연간 결핵감염 위험률이 5.3%이던 것이 체계적인 결핵관리사업 등으로 유병률이 꾸준히 감소하여 1995년에는 0.5%로 감소되었다. 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 et al., 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 둔화나 일시적인 증가 추세로 전

Table 6. Comparison of the time required both first sputum and second sputum

(unit: day)

Number	Contamination day ^A	Results PCR	R.D.S ^B day	Interim closing ^C	Request day	Total day ^D	Delay day ^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
12	13	-	No test	13	13	26	15
13	11	-	No test	11	11	22	11

^A: smears + culture day

^B: Rapid Drug Susceptibility Testing

^C: Contamination day + R.D.S day

^D: Interim closing + Request day

^E: Total day - Interim closing

환할 것으로 보고 있으며, 특히 유의할 점은 다제내성환자의 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 비말핵이 배출되어 이 공기 중에 떠 있다가 다른 사람의 호흡기로 들어가서 호흡기기관지나 폐포에 도달하면 감염을 일으킨다 (Collins et al., 1985; Grange, 1988). 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 시급하게 요하는 환자들이다 (Blair et al., 1976; Toman, 1979). 배양검사는 결핵균을 동정할 수 있어서 확실한 진단이 가능하고 소수의 균도 검출할 수 있으며 약제감수성검사를 위해서는 반드시 필요하지만 균의 세대증식 기간이 길어 결과보고까지 시간이 오래 걸리는 단점이 있다 (Kim et al., 1989; Padungchan et al., 1986). 약제감수성검사는 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 중합효소연쇄반응법은 고온균으로부터 얻은 DNA 중합효소를 이용한 DNA를 증폭합성법은 민감도와 특이도가 매우 높아 각종 병리 가검물 내 병원

균 검출에 널리 이용된다 (Saiki et al., 1988; Arrud et al., 1993). 신속감수성검사는 다중중합효소연쇄반응 후 증폭 산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 탐침자가 접합된 스트립에 역 교잡시켜 리팜피신과 아이나 내성을 동시에 진단하는 것으로 2~3일 만에 내성 여부를 알 수 있기 때문에 신속하고 적절한 처방을 하는데 매우 유용하게 쓰인다 (Pietrzak et al., 1994; Vijdea et al., 2008).

본 연구는 요즘 다제내성결핵균이 증가하여 사회적, 국가적으로 민감한 상황에 당면하고 있음을 인식하여 조기에 내성균 감염자를 찾아내어 신속하고 적절하게 치료할 수 있게 하여 더 이상의 내성균의 전파를 막고 환자에게도 빠른 완치로 행복하고 건강한 삶을 영위할 수 있도록 도움을 주기 위해서 실시하게 되었다. 현재까지 도말검사 결과 양성인 검체 중에 배양검사에서 잡균에 의한 오염으로 판독이 불가능한 경우에는 다시 재 채담 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 다시 도말검사, 배양검사의 과정을 거치면서 신속감수성검사를 하기까지의 소요

되는 일수를 서로 비교·분석한 결과 재 채담하여 검체의 결과를 분석하기까지 지체된 평균 시간은 12.2일이 더 소요됨을 알 수 있었다. 배양 중에 오염된 검체를 분리하여 도말검사 결과를 확인 후 양성인 경우에는 오염원을 제거하여 다중중합효소연쇄반응을 실시하여 인형결핵균인지를 확인하였더니 인형결핵균 11건, 비결핵항산균 1건, 검사 불능 검체 1건 등으로 확인되었다 (Table 4). 인형결핵균으로 확인된 검체의 다중중합효소연쇄반응 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 돌연변이형에 특이한 탐침자가 접합된 스트립에 역 교잡시켜 리팜피신과 아이나 내성 여부를 검사하였더니 Table 5와 같이 리팜피신에는 0건이 내성이고 10건이 감수성이었고, 아이나에서는 3건이 내성이고 7건이 감수성으로 보였으며 검사 불능 1건의 결과를 얻었다. 첫 번째 의뢰된 검사의 도말검사의 결과와 재의뢰 시 도말검사 결과를 비교한 결과 총 오염된 13건 중 도말검사 결과 일치가 11건, 불일치가 1건, 미의뢰 1건의 결과를 얻게 되었다.

본 연구에서 지금까지는 배양 중에 오염이 발생되면 그 검체를 판독불가로 판정하고 살균처리 후 폐기하고 다시 재 채담검체를 의뢰를 요구하여 처음부터 검사를 다시 해야 하는 번거로움과 시간적, 경제적인 문제를 야기 시켰으나 배양 중 오염이 되더라도 오염원을 제거하고 신속감수성검사를 실시할 수 있음을 확인하고, 이러한 실험 결과를 통해 인형결핵환자의 보다 빠른 치료와 적절한 처방으로 결핵환자를 치료에 큰 도움이 될 수 있기를 기대한다.

REFERENCES

- Arnvig KB, Young DB. Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2009. 73: 397-408.
- Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. Cloning of an *Mycobacterium tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science. 1993. 261: 1454-1457.
- Bai GH, Park YK, Choi YW, Bai JI, Kim HJ, Chang CL, Lee JK, Kim SJ. Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. Int J Tuberc Lung Dis. 2007. 11: 571-576.
- Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. Bacteriol Rev. 1977. 41: 217-372.
- Blair EB, Brown GL, Tull AH. Computer files and analyses of laboratory data from tuberculosis patients. II. Analyses of six years' data on sputum specimens. Am Rev Respir Dis. 1976. 113: 427-432.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998. 393: 537-544.
- Collins CH, Grange JM, Noble WC, Yates MD. *Mycobacterium marinum* infections in man. J Hyg (Lond). 1985. 94: 135-149.
- Grange JM. Lupus and leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1988. 56: 111-112.
- Grange JM. The mystery of the mycobacterial 'persistor'. Tuberc Lung Dis. 1992. 73: 249-251.
- Groothuis DG, Yates MD (ED). Diagnostic and public health mycobacteriology, 2nd ed. Bureau of hygiene and tropical diseases. London. 1991.
- Imperiale BR, Zumárraga MJ, Weltman G, Zudiker R, Cataldi AA, Morcillo NS. First evaluation in Argentina of the GenoType® MTBDRplus assay for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection from clinical isolates and specimens. Rev Argent Microbiol. 2012. 44: 283-289.
- Jeon DS, Shin DO, Kang HS, Sung NM, Kweon KS, Shin E, Kim KS, Lee MH, Park SK. Trend of Multidrug and Extensively Drug Resistant Tuberculosis in a Tuberculosis Referral Hospital, 2001~2005. Tuberc Respir Dis. 2008. 64: 187-193.
- Jin BW, Hong YP, Kim SJ. A contact study to evaluate the BCG vaccination tuberculosis programme in Seoul Tubercle. 1989. 70: 241.
- Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology. a Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, Georgia, USA: DHHS, CDC. 1985. 35.
- Kim EJ, Choi WS, Hwang SY. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR from trace clinical specimens and paraffin-embedded tissue. Korean J Biomed Lab Sci. 2000. 6: 56-63.
- Kim SJ, Bai GH, Hwang HD. Tubercle Bacilli in the Sputum Specimens. Tuberc Respir Dis. 1989. 36: 354-361.
- Lei Z, Yuanxing Y, Lina D, Tingting W, Xingbo S, Xiaojun L, Binwu Y, Lanlan W. Application of GenoType MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex

- as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volume laboratory in Southern China. *Mol Biol Rep*. 2010. 38: 2185-2192.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987. 155: 335-350.
- Padungchan S, Konjanart S, Kasiratta S, Datamas S, ten Dam HG. The effectiveness of BCG Vaccination of the Konjanation of the newborn against childhood tuberculosis in Bangkok. *Bull WHO*. 1986. 64: 247.
- Padungchan S, Konjanart S, Kasiratta S, Daramas S, ten Dam HG. vaccination programme in Seoul. *Tubercle*. 1987. 70: 241.
- Pietrzak J, Frei R, Senn HP, Moroni C. Comparison of polymerase chain reaction with standard methods in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994. 13: 1079-1083.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology*. 1992. 24: 476-480.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239: 487-491.
- Toman K. How can progress of treatment result be assessed?. In *Tuberculosis*. Geneva. WHO. 1979. 179.
- Vijdea R, Stegger M, Sosnovskaja A, Andersen ÅB, Thomsen VØ, 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*. 2008. 27: 1079-1086.
-