Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Study on the Growth Factors for Rapidly Cultivating
Mycobacterium spp.Sung-Il Ha¹, Kang-Gyun Park¹, Hyun-Soo Suk¹, Jeong-Seob Shin¹, Dong-Pil Shin¹, Min-O Kwon¹,
Yeon-Joon Park²¹Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul Saint Mary's Hospital, Seoul, Korea²Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea마이코박테리움을 신속하게 배양할 수 있는 성장 인자에 관한
연구하성일¹, 박강균¹, 석현수¹, 신정섭¹, 신동필¹, 권민오¹, 박연준²¹가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과, ²가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학과

ARTICLE INFO

Received February 1, 2019
Revised 1st February 26, 2019
Revised 2nd March 7, 2019
Revised 3rd March 11, 2019
Accepted March 12, 2019

Key words

Activated charcoal
Defibrinated sheep blood
L-ascorbic acid

ABSTRACT

Mycobacteria grow slowly. Therefore, a solid medium should be used for eight weeks and a liquid medium for six weeks. The purpose of this study was to find the growth factors that can grow *Mycobacterium* rapidly and to help develop a solid medium for rapid identification. Three types of *Mycobacterium* growth factors were evaluated with 10 *Mycobacteria* by adding activated charcoal, defibrinated sheep blood, and L-ascorbic acid to Difco™ *Mycobacteria* 7H11 agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). The time to detection and the distinguishability of a colony were compared with that of the current method. In the rapidly growing *Mycobacterium*, the difference in detection time between the new media and conventional media confirmed that the new media was faster. *M. kansasii* and *M. intracellulare* grew faster in 7H11 C than in 7H11 medium. MTB grew faster than the other media in 7H11 C. This study confirmed that the two growth factors affect fast-growing *Mycobacteria* and slow-growing *Mycobacteria*. 7H11 C showed better distinguishability than the conventional media in all 10 *Mycobacterium* due to the color contrast. In particular, when the MTB was grown, the size of the colonies was larger than with other media, so visualization was easy.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

「감염병 예방 및 관리에 관한 법률」에 의하여 제3군 법정 감염병으로 지정되어 관리하는 공기매개 감염질환인 결핵은 *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) 복합체의 구성원에 의한 세균감염 질병이다. 전염성 결핵 환자와 접촉하게 되면 30%가

감염되고, 감염된 사람 중 90%는 잠복 결핵 상태로 유지되며, 약 10%에서 환자로 진행된다. 특히, human immunodeficiency virus (HIV), 영양실조, 당뇨, 흡연 등 면역력이 저하된 사람들은 결핵에 걸릴 확률이 높아지며, 신체의 모든 부분을 침범할 수 있고, 그중 폐결핵이 대부분(80~90%)을 차지하고 있다[1].

폐결핵 이외에 폐 질환의 원인균으로 알려진 비결핵성항산균(non-tuberculous mycobacteria, NTM)은 자연의 물이나 토양 등 자연환경에 널리 분포하며, 감염 증상은 폐 질환, 림프절염, 피부, 파종성 질환 등 크게 4가지 특징적인 임상 증상으로 구분된다. 그중 폐 질환은 NTM 감염의 90% 이상을 차지하며

* Corresponding author: Sung-Il Ha
Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul Saint Mary's Hospital, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 06591, Korea
E-mail: hsi0708@hanmail.net
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6690-2766>

액체배지 사용으로 임상 검체에서 분리 빈도가 높아지고 있다 [2, 3]. NTM 감염은 임상 증상이 결핵과 유사하여 감별하기 힘들고, 기존 항결핵제에 높은 내성을 나타내어 치료 효율이 높지 않아 장기간 약제 병용요법으로 치료를 실시한다. 감염 경로는 토양, 자연수 등에 존재하는 균이 공기를 통해 감염되는 것으로 알려져 있다[2, 4].

결핵균 배양 검사의 경우, 검체 내에 균 수가 10^3 CFU/mL 이상으로 존재할 경우는 결핵균 검출 시간이 단축될 수 있지만, 균 수가 10 CFU/mL 정도로 적거나, 전처리 과정에서 알칼리에 노출되어 활성도가 떨어지거나, 균 자체가 대사적으로 활성을 멈춘 경우에는 최소 4주 이상의 시간이 소요되기 때문에 조기 진단에 어려움이 많다.

현재 *Mycobacterium* 진단을 위해 대표적으로 사용하고 있는 자동화 배양 장비인, BD BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacteria* culture system (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)은 액체배지인 *Mycobacterium* Growth Indicator Tube (MGIT)를 사용함으로써 기존의 고체배지에 비해 양성률이 높고, 배양 기간을 획기적으로 단축시켰지만 장비 가격이 고가이고, 오염률이 높고[5], 두 가지 이상의 균이 자랐을 경우에는 동정 확인이 어려우며, 결정적으로 치료를 위한 감수성 검사를 시행하지 못하는 단점이 있다. 반면에 고체배지는 오염률이 낮고, 집락 관찰이 용이한 장점이 있지만, 성장이 늦고 양성률이 낮다는 단점을 가지고 있다. 결핵균 검출 평균 시간은 고체배지인 thin-layer agar (TLA) Middlebrook 7H11 agar (including 10% OADC [oleic acid, albumin, dextrose, catalase])와 BACTEC MGIT 960을 비교했을 때, 12.5일과 11.2일로 보고하였다[6].

*Mycobacterium*의 성장 인자에 대한 이전의 연구 결과에서 7% defibrinated sheep blood (DSB)를 사용하였을 경우, Löwenstein-Jensen (L-J) medium (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) 비해 *Mycobacterium tuberculosis*의 성장 속도가 빠르다는 것을 확인할 수 있고[7], 5% sheep-blood agar (Bio Technologie Appliquée, Dinan, France)를 이용하였을 경우, L-J medium보다 *Mycobacterium tuberculosis* 성장이 빠른 것을 확인할 수 있었다[8]. 따라서, 결핵균은 혈액이 포함된 배지에서 빠르게 성장하는 것을 확인할 수 있다[9].

아스코르브산(L-ascorbic acid, AA)은 vitamin C로 알려져 있고, 대표적인 기능은 강력한 산화 방지제로서 활성산소를 제거한다. 미호기성(microaerophilic, 2.5~5% O₂+5% CO₂) 환경은 반고체배지에서 *Mycobacterium genavense*의 성장을 촉진하는 것으로 보고하였다[10]. 그러나 미호기성 환경을 조

성하기 위해서는 검사 비용이 증가하게 되므로, AA 100 mg/L을 배지에 첨가하면 미호기성 환경과 동일한 환경을 조성하여 결핵균 배양 및 리팜피신(rifampicin) 감수성 검사 시간을 단축할 수 있는 것으로 보고하였다[11]. 또한 활성탄(activated charcoal, AC)은 Middlebrook 7H11 (Becton, Dickinson and Company)에 농도 0.2% (w/v)가 되도록 첨가하고 phosphoric acid로 pH 6.2 ± 0.2 로 산성화시키면 느리게 성장하는 *Mycobacterium genavense*의 성장을 촉진하는 것으로 보고하였다[12].

본 연구의 목적은 보고된 성장 인자(DSB, AA, AC)를 다양한 조합으로 배지를 제조하여 *Mycobacterium*의 성장과 연관성을 규명하고, 결핵균 및 비결핵성항산균에서 빠른 성장 인자를 찾아 신속한 동정에 활용하여 고체배지의 개발에 기초정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. Difco™ *Mycobacteria* 7H11 agar 배지 제조

Difco™ *Mycobacteria* 7H11 agar (Becton, Dickinson and Company)는 5 mL의 glycerol (Duksan pure chemicals, Seoul, Korea)을 포함한 900 mL의 3차 증류수에 21 g의 agar를 녹인 후 121°C에서 15분간 가압 멸균하여 50~55°C까지 실온에 방치하고 100 mL의 Bacto Middlebrook OADC enrichment (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 첨가하여 petri dish (85 mm) (GREEN CROSS Co, Seoul, Korea)에 20 mL씩 분주하여 식힌 후 냉장 보관하였다.

2. 성장 인자를 첨가한 배지 제조

1차적인 선별 배지의 조합은 7H11 agar를 기본으로 하여 AA (100 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; M.W 176.12) 첨가한 배지(7H11 A), defibrinated sheep-blood (DSB) (South Pacific Sera Limited, TIMARU, New Zealand)의 농도를 5% 첨가된 배지(7H11 5SB), AA (100 mg/L)와 5% DSB를 첨가한 배지(7H11 A5SB)로 구분하여 배지를 제조하였다. 2차적인 조합은 7H11 agar에 AC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; M.W 12.01) 농도를 0.2%가 되게 첨가한 배지(7H11 C), 7H11 C 배지에 DSB를 농도별로 제조한 배지로 5% 첨가한 배지(7H11 C5SB), 7% 첨가한 배지(7H11 C7SB)로 구분하여 배지를 제조하였다(Table 1). 최종 연구는 0.2% AC, 5% DSB를 첨가하고 monopotassium phosphate를 이용해 각각 pH (6.70, 6.74, 6.60)별로 제조하였다(Table 2).

3. 균주 사용 및 제조

연구에 사용한 표준균주(American Type Culture Collection, ATCC)는 빠르게 성장하는 균 *M. fortuitum* (ATCC 6841), 느리게 성장하는 균 H37Ra (ATCC 35835), *M. intracellulare* (ATCC 13950)의 3종 사용하였다. 최종 연구에서는 추가로 빠르게 성장하는 균 4종 *M. chelonae* (ATCC 35749), *M. massiliense* (ATCC 307), *M. abscessus* (ATCC 308), *M. peregrinum* (ATCC 700686)를 사용하였고, 느리게 성장하는 *M. avium* (ATCC 35719), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. tuberculosis* (ATCC 27293)의 3종을 포함하여 총 10 균주를 사용하였다. 균 부유액은 15 mL tube에 멸균증류수를 10 mL 채우고 loop을 이용하여 적당량의 표준균주를 부유시킨 후, 멸균된 직경 3 mm bead를 이용해서 진탕하여 균액을 균질화한 후, 3 mL의 멸균증류수가 담긴 시험관에 균 부유액을 첨가하여 Mcfarland 0.5탁도(균수 1.5×10^8 CFU/mL)로 조정하였다. 또한 이 부유액을 $1.5 \times 10^7 \sim 10^2$ CFU/mL까지 희석

수행하였다.

4. 접종 농도

1차 선별 연구에서는 단계 희석한 검체 100 μ L를 배지에 접종하였다. 2차 선별 연구에서는 접종 농도가 높아 빠르게 성장하는 비결핵성항산균의 성장 차이를 관찰하기 어려워 농도를 낮추어 100 μ L의 검체를 접종하였다. 최종 연구에서 검체 접종은 선별 검사에서 성장 인자를 찾는 데 초점을 맞추기보다는 적절하게 조합된 배지에 균종에 따른 성장 속도를 확인하기 위해 단계 희석한 균 부유액 100 μ L를 접종하였다(Table 3).

5. 배양조건 및 평가방법

접종된 배지는 임상 검체와 동일한 조건인, 5% CO₂, 35~37°C에서 액체배지 6주, 고체배지 8주간 배양하였다[13]. 평가를 위해 매일 1회 관찰하여 고체배지에서 집락이 있는 경우와 MGIT액체배지에서 양성 감지 신호가 확인된 경우에는 모두 항산균 염색(Ziehl-Neelsen법)을 통하여 확인 검사를 시행하였다. 선별 연구의 평가 지표는 집락을 형성하는데 걸린 시간(time to detection, TTD)을 설정하여 전체 농도의 평균값으로 산출하였고, 최종적으로는 집락의 육안 판독에 대한 용이성을 추가하여 최종 평가하였다.

Table 1. Composition of the Mycobacteria 7H11 agar in the 1st and 2nd screening test

Medium	Additives			
	0.2% AC	5% DSB	7% DSB	L-AA
7H11	—	—	—	—
7H11 A	—	—	—	+
7H11 5SB	—	+	—	—
7H11 A5SB	—	+	—	+
7H11 C	+	—	—	—
7H11 C5SB	+	+	—	—
7H11 C7SB	+	—	+	—

Mycobacteria 7H11 agar are supplemented with the following components.

Abbreviations: 7H11, Mycobacteria 7H11 agar; A, 100 mg/L L-ascorbic acid; 5SB, 5% defibrinated sheep-blood; A5SB, 100 mg/L L-ascorbic acid+5% defibrinated sheep-blood; C, 0.2% activated charcoal; C5SB, 0.2% activated charcoal+5% defibrinated sheep-blood; C7SB, 0.2% activated charcoal+7% defibrinated sheep-blood; AC, activated charcoal; DSB, defibrinated sheep-blood; L-AA, L-ascorbic acid.

Table 2. Final composition and individual pH in the Mycobacteria 7H11 agar included additives

Medium	Additives		Acidification	pH (55°C)
	0.2% AC	5% DSB		Final
7H11	—	—	—	6.70
7H11 C	+	—	—	6.74
7H11 CP5SB	+	+	+	6.60

Mycobacteria 7H11 agar are supplemented with the following components.

Abbreviations: See Table 1; 7H11 CP5SB, 0.2% activated charcoal+acidification with 1.5 g monopotassium phosphate+5% defibrinated sheep-blood.

결 과

1. TTD 분석

1차 선별 연구에서 느리게 성장하는 H37Ra는 DSB를 첨가하

Table 3. Concentrations of inoculation

Test	Mycobacterium spp.			
	Concentration of inoculation (CFU/mL)			
1 st screening	1.5×10^8	1.5×10^6	1.5×10^4	1.5×10^2
2 nd screening	1.5×10^5	1.5×10^4	1.5×10^3	1.5×10^2
Final	1.5×10^7	1.5×10^5	1.5×10^3	—

였을 경우 평가에 이용한 다른 배지보다 가장 빠르게 성장하였고, L-AA를 단독으로 첨가한 배지와 7H11 배지의 성장 속도에서는 유의한 차이를 관찰할 수 없었으며, L-AA와 DSB를 모두 첨가한 배지와 DSB만을 첨가한 배지에서 유의한 성장 차이를 보이지 않아 DSB를 성장 인자로 선택하였다(Table 2).

2차 선별 연구에서 0.2% AC를 첨가한 배지에서 느리게 성장하는 *M. intracellulare*는 평가에 이용된 다른 배지보다 가장 먼저 성장하였다(Table 3). 그리고 DSB의 5%, 7% 첨가한 평가에서는 5%에서 더 빠르게 성장하여, 5% DSB와 0.2% AC를 성장

인자로 선택하였다(Table 4).

최종 연구에서 빠르게 성장하는 *Mycobacterium* 균종의 집락을 형성하는데 걸린 시간을 보면 0.2% AC 단독 포함된 7H11 C 배지에서 가장 빠른 것이 확인되었고, 7H11 CP5SB에서도 빠르게 성장하는 *Mycobacterium*은 현재 사용 중인 Ogawa medium, MGIT 액체배지보다 빠른 성장을 확인하였다. 하지만 AC 단독으로 첨가한 7H11 C보다 느리게 성장하였다(Table 5).

느리게 성장하는 *Mycobacterium* 균종에서 H37Ra를 제외한 나머지 균종은 7H11 C에서 평균 성장 시간이 가장 빠른 것을

Table 4. Mean of time to detection in *Mycobacterium* spp.

Test	Culture system	Mean of time to detection (days)		
		<i>M. fortuitum</i>	<i>M. intracellulare</i>	H37Ra
1 st Screening	7H11	3.0	10.3	25.0
	7H11 A	3.0	10.3	24.8
	7H11 5SB	3.0	10.3	24.0
	7H11 A5SB	3.0	11.5	24.0
	3% Ogawa	3.0	17.3	28.0
2 nd screening	MGIT	5.3	19.8	20.3
	7H11	4.5	12.5	27.5
	7H11 C	4.5	10.8	26.5
	7H11 5SB	2.5	12.0	26.5
	7H11 7SB	3.0	14.0	27.0
	3% Ogawa	3.3	18.8	29.5

Abbreviations: See Table 1; MGIT, Mycobacterium growth indicator tube.

Table 5. Mean of time to detection in rapid-growth *Mycobacterium* spp.

Culture system	Mean of time to detection (days)				
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. peregrinum</i>
MGIT	3.3	24.3	3.7	5.3	4.0
7H11	2.3	3.0	3.3	2.3	3.0
7H11 C	2.3	3.0	3.3	2.3	2.3
7H11 CP5SB	2.3	3.0	3.3	2.7	2.3
3% Ogawa	2.7	7.0	3.3	3.3	3.7

Abbreviations: See Table 1; 7H11 CP5SB, 0.2% activated charcoal+acidification with 1.5 g monopotassium phosphate+5% defibrinated sheep-blood; MGIT, Mycobacterium growth indicator tube.

Table 6. Mean of time to detection in slow-growth *Mycobacterium* spp.

Culture system	Mean of time to detection (days)				
	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. tuberculosis</i>	H37Ra
MGIT	10.0	8.0	33.3	14.3	16.0
7H11	8.3	7.7	7.3	14.0	28.3
7H11 C	8.3	5.7	6.7	12.0	20.7
7H11 CP5SB	7.7	6.3	7.3	12.0	20.7
3% Ogawa	11.3	11.3	10.0	15.3	29.3

Abbreviations: See Table 1; 7H11 CP5SB, 0.2% activated charcoal+acidification with 1.5 g monopotassium phosphate+5% defibrinated sheep-blood; MGIT, Mycobacterium growth indicator tube.

확인하였고, *Mycobacterium* 동정에 있어 가장 중요한 MTB도 7H11 C 배지에서 다른 배지보다 평균 2일 이상 빠르게 성장하였다. AC 단독 첨가한 배지와 AC와 DSB를 함께 첨가한 배지의 평균 성장 속도를 보게 되면, *M. avium*을 제외한 나머지 균종에서 AC를 첨가한 배지에서 빠르게 성장하였다(Table 6).

2. 집락 판독 용이성

*Mycobacterium*의 대부분은 7H11 배지에서 집락을 형성할 경우, 대부분 흰색이거나 크림색으로 성장한다. 7H11 배지에서 집락 형성 초기에 소수의 집락이 관찰될 때 육안 판독이 용이하지 않아 양성 결과가 1~2일 정도 늦게 판독된다. 연구에 사용한 *Mycobacterium* 10종에서 모두 7H11 배지보다 0.2% AC 포함된 배지에서 육안 판독이 우수한 것을 확인하였다(Figure 1). 또한 1.5×10^4 CFU/mL로 접종하고 15일 배양된 *Mycobacterium tuberculosis* 집락의 크기는 7H11 C 배지가 7H11 CP5SB 배지보다 커서 육안 판독 용이성이 우수하게 나타났다

(Figure 2).

고 찰

L-AA를 제외한 2종류의 성장 인자가 빠르게 성장하는 *Mycobacterium*과 느리게 성장하는 *Mycobacterium* 모두의 성장에 도움이 되는 것이 본 연구를 통하여 확인하였다. 7H11 배지에서 *Mycobacterium*이 성장할 경우 집락 관찰이 어려움이 있는 반면 AC이 포함된 배지에서는 진한 회색 바탕에 흰색 및 크림색 집락을 보이는 *Mycobacterium*의 판독이 용이하였고, 균 성장 속도, 육안 판독 능력이 우수하여 환자 검체를 이용한 방법에서도 동일한 결과가 도출된다면, 현재 사용하는 Ogawa, 7H11 medium을 대체하여 *Mycobacterium*을 빠르게 진단하기 위한 선택 배지로 사용하여도 좋을 것으로 생각한다.

이번 연구에서 성장 인자 중 AC에 대한 연구 결과가 가장 좋은 것으로 확인되었다. 어떠한 역할에 의해서 대부분의

Figure 1. Colonies grown in (a) Mycobacteria 7H11 C in 2 days and (b) 7H11 medium C in 3 days (*M. peregrinum* was inoculated with 1.5×10^2 CFU/mL) confirming the medium containing activated charcoal in 7H11 is much better than the 7H11 medium in visual recognition.

Figure 2. *M. tuberculosis* is easier to visualize at 7H11 C (b) because the size of the colonies are larger than 7H11 CP 5SB (a).

*Mycobacterium*이 빠르게 성장했는지 의문이 가는 사항이다. AC은 독성이 없으면, 공기, 토양, 물에서 존재하는 광범위한 오염물질을 제거하며, 살균 능력을 가지고 있다[14]. 7H11 agar에서 *Mycobacterium*이 성장할 때 암모니아를 발생하여 알칼리 환경을 조성한다[13]. AC은 이러한 대사산물을 제거하며, *Mycobacterium*가 잘 자랄 수 있게 배지 환경을 조성하여 성장을 촉진시켰는지를 추론해 보며, 추가 연구로 잡균이 섞여 있는 환자 검체를 이용하여 확인을 해 보아야 할 것이다.

1차 선별 연구에서 DSB와 L-AA을 함께 첨가한 배지가 DSB만 첨가한 배지보다 3종의 *Mycobacterium*이 모두 빠르게 성장할 것으로 예상 되었지만, DSB만 첨가한 배지에서 *M. intracellulare*의 평균 성장 기간이 1.2일 정도 빠르게 배양 되었다. DSB가 첨가 되었을 경우 배지 산도에 의해 용혈이 발생하여 적혈구 내에 존재하는 철 성분이 세포 밖으로 유출되어 비타민과 철 성분의 Fenton reaction으로 *Mycobacterium*에 대한 살균 작용을 하여 성장이 억제되었는지 의심이 가는 사항이며 [15], 혈액을 사용한 배지의 경우 오랜 기간 배양에 불리하였고, 배양 중 오염률이 높은 것을 확인할 수 있었다[16].

L-AA를 배지에 첨가하면 미호기성 환경과 동일한 환경을 조성하여 결핵균 배양 및 rifampicin 감수성 검사 시간을 단축한다[11]. 검증을 위해 빠르게 성장하는 *M. fortuitum*을 이용하여 배양한 결과 배지에서 이틀째 배양되었다. L-AA+AC를 포함한 배지보다 AC만 포함된 배지에서 집락의 크기는 비슷하나, 집락의 수가 더 많은 것을 확인하였고, 배양 조건의 비교는 7H11 C 배지를 미호기성 조건과 5% CO₂ 환경에서 배양한 결과 5% CO₂ 환경에서 집락의 수와 크기가 더 큰 것을 확인하였다. 7H11 CP5SB 배지 산도가 pH 6.60으로 결핵균의 최적 산도인 pH 6.20 보다 조금 높았으나 AC 만 첨가한 배지보다 산도가 결핵균 최적 산도에 가까웠다. 다음 연구에서는 AC와 DSB를 성장 인자로 monopotassium phosphate의 용량을 조절하여 산도에 따른 결핵균의 성장 속도와 AC와 L-AA 조합한 배지로 추가적인 연구를 진행해 보았으면 한다.

여러 논문이나 제조사에서 언급하듯이 액체배지가 고체배지보다 *Mycobacterium* 성장에 있어 빠르다고 언급하고 있다. 그러나 본 연구에서는 상반된 결과로 H37Ra를 제외한 9개 균주 모두에서 3% Ogawa를 제외한 고체배지에서 액체배지인 MGIT보다 양성 검출 시간이 빨랐다. 이러한 결과가 도출된 이유에 대하여 추론한 결과 검체의 접종량을 비교해 보면 고체배지는 100 µL검체를 접종하는 반면에 액체배지는 500 µL검체를 접종하라고 제조사에서 권장하고 있다. 그래서 접종량에 따른 성장 속도를 확인을 위해 고체배지와 액체배지에 500 µL씩

동일하게 접종한 연구 결과를 확인해 보면 BD BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacteria* culture system (Becton, Dickinson and Company)는 결핵균의 평균 성장 시간이 11.6일, 7H11 배지에서는 평균 18.9일로 확인되었다[17]. 그러나 100 µL 검체 접종량이 성장 시간과의 상관관계를 확인하기 어려워 MGIT에서 검체의 양에 따른 양성 시간을 확인을 해 보아야 할 것이며, 고체배지와 액체배지에 500 µL를 접종하여 비교할 때에는 고체배지 접종을 할 때는 원침 후 400 µL의 상층액을 버리고 농축된 100 µL를 접종하여 비교해야 정확할 것으로 생각된다.

*Mycobacterium*의 성장 촉진을 위해 배지에 여러 영양분을 첨가하는 방법과 다르게 전사 촉진 인자를 이용하는 방법도 알려져 있다. 결핵균의 전사과정 중 RNA chain 합성속도가 성장 속도에 영향을 준다. 결핵균은 다른 세균에 비해 promoter 부분에 G+C 함량이 높아 전사 속도가 대장균보다 약 10배 정도 느리다[18, 19]. 그래서 결핵균은 전사 시작 단계부터 반응이 느려서 전체적인 전사과정에 영향을 주게 되어, 결과적으로 필요한 단백질의 합성이 지연되어 결핵균의 성장 속도를 느리게 하는 데 영향을 주고 있다[20]. 전사조절 물질인 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)는 세포에서 pH, 산소 농도 등 환경적인 변화를 감지하여 유전자 발현을 조절하는 second messenger로서 작용한다. 결핵균에서 cAMP의 역할을 보고자 배지에 dibutyryl cAMP를 첨가하고 glucose, albumin 등을 제한하여 배양했을 때, 영양결핍 상태를 극복하기 위해 결핵균은 많은 양의 cAMP를 분비하여 전체적인 유전자 발현을 조절하는 것으로 밝혀졌다[21].

성장 인자의 첨가 방식으로 *M. kansasii*(ATCC 12478) 균주의 세포벽 성분을 포함한 결핵균 배지는 결핵균의 성장 속도를 촉진할 뿐만 아니라 전처리 과정 중 손상된 결핵균을 능동적 배양상태로 돌려놓음으로써 결핵균의 검출 시기를 앞당긴다. 그러나 *M. kansasii*의 세포벽 성분 추출액의 대량 생산에 어려움이 있어 경제적이지 못하다[22].

이번 연구를 통해서 성장 인자를 영양분으로 하여 배지에 첨가하는 방식으로 배지를 개발할 수 있다. 하지만, 결핵균의 전사 촉진인자 또는 새로운 연구를 통해 다른 인자를 찾아 함께 이용한다면 진단에 있어 신속하고, 획기적인 고체배지의 개발에 한 걸음 더 다가갈 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

*Mycobacterium*은 느리게 성장한다. 따라서 고체배지는 8주, 액체배지는 6주 동안 사용하여야 한다. 이 연구의 목적은

*Mycobacterium*을 빠르게 성장시킬 수 있는 성장 인자를 찾고, 신속한 동정을 위한 고체배지를 개발하는 데 도움을 주는 것이다. Difco™ *Mycobacteria* 7H11 agar (Becton, Dickinson and Company)에 activated charcoal, defibrinated sheep blood, L-ascorbic acid를 첨가하여 10종의 *Mycobacteria* 가 지고 *Mycobacterium* 성장 인자 3가지를 평가하였다. 집락의 검출 시간 및 판독 용이성을 현재의 방법과 비교하였다. 빠르게 성장하는 *Mycobacterium* 있어 새로운 배지와 기존의 배지에서 검출 시간의 차이는 새로운 배지가 더 빠르다는 것을 확인시켜 주었다. *M. kansasii*와 *M. intracellulare*는 7H11 배지보다 7H11 C 배지에서 더 빠르게 자라는 것으로 확인되었다. MTB는 7H11 C 배지에서 다른 배지보다 빠르게 성장하였다. 이 연구는 2 두 가지 성장 인자가 빠르게 성장하는 *Mycobacteria*과 느리게 성장하는 *Mycobacteria*에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 7H11 C 배지는 색상 대비로 인하여 10종의 모든 *Mycobacterium*에서 기존배지보다 더 뛰어난 판독 용이성을 보여 주었다. 특히, MTB가 성장했을 경우 집락의 크기가 다른 배지에서 보다 커서 시각화가 용이하였다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Ha SI¹, M.T.; Park KG¹, M.T.; Suk HS¹, M.T.; Shin JS¹, M.T.; Shin DP¹, M.T.; Kwon MO¹, M.T.; Park YJ², M.D.

REFERENCES

1. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for national tuberculosis control, 2018. Cheong-Ju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2018. p470.
2. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, et al. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:231-2. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.185.2.231>.
3. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(2 Pt 2):1-25. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.2.atsstatement>.
4. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci*. 2005;20:913-25. <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.6.913>.
5. Diriba G, Kebede A, Yaregal Z, Getahun M, Tadesse M, Meaza A, et al. Performance of *Mycobacterium* Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein-Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes*. 2017;10:181. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2497-9>.
6. Satti L, Ikram A, Abbasi S, Malik N, Mirza IA, Martin A. Evaluation of thin-layer agar 7H11 for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14:1354-1356.
7. Mathur ML, Gaur J, Sharma R, Solanki A. Rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar in resource limited setting. *Dan Med Bull*. 2009;56:208-210.
8. Drancourt M, Carrieri P, Gévaudan MJ, Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1710-1711. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1710-1711.2003>.
9. Gil-Setas A, Mazon A, Alfaro J, Idigoras P. Blood agar, chocolate agar, and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4008. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.4008.2003>.
10. Realini L, De Ridder K, Palomino J, Hirschel B, Portaels F. Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2565-2570.
11. Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2014;4:4236. <https://doi.org/10.1038/srep04236>.
12. Realini L, De Ridder K, Hirschel B, Portaels F. Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of *Mycobacterium genavense*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34:45-50. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00014-0).
13. Middlebrook G, Cohn ML. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Public Health Nations Health*. 1958;48:844-853.
14. Tenenbein M, Cohen S, Sitar DS. Efficacy of ipecac-induced emesis, orogastric lavage, and activated charcoal for acute drug overdose. *An Emerg Med*. 1987;16:838-841. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(87\)80518-8](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(87)80518-8).
15. Vilcheze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs WR, Jr. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced fenton reaction. *Nat Commun*. 2013;4:1881. <https://doi.org/10.1038/ncomms2898>.
16. Palange P, Narang R, Kandi V. Evaluation of culture media for isolation of *Mycobacterium* species from human clinical specimens. *Cureus*. 2016;8:E757. <https://doi.org/10.7759/cureus.757>.
17. Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:569-574.
18. Chauhan A, Madiraju MV, Fol M, Lofton H, Maloney E, Reynolds R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol*. 2006;188:1856-1865. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1856-1865.2006>.
19. Bashyam MD, Kaushal D, Dasgupta SK, Tyagi AK. A study of mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol*. 1996;178:4847-4853.
20. Winder FG. Mole of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobac-

- teria, New York: Academic Press; 1982.
21. Gazdik MA, McDonough KA. Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. *J Bacteriol.* 2005;187:2681-2692. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2681-2692.2005>.
 22. Hahn MY. Development of growth-enhancing medium containing growth-promoting factors for *Mycobacterium tuberculosis* culture. Academic research report. Seoul: Yonsei University Industry Academic Cooperation Foundation; 2012. p55.