

***Mycobacterium leprae*의 Ziehl-Neelson's AFB stain과 Fluorescence stain 비교분석 (예보)**

한국한센복지협회

김연실, 이희숙, 이민석, 김종필

Abstract

Comparative analysis of Fluorescence stain and Ziehl-Neelsen's AFB stain for *Mycobacterium leprae* (pilot study)

Youn-Sil Kim, Hee-Suk Lee, Min-Seok Lee, Jong-Pill Kim

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

The Ziehl-Neelson's AFB staining method was mainly used for the AFB observation of the mycobacteria. However, this method has several issues of false negative results, and hence a comparative experiment of the Ziehl-Neelson's AFB staining and the fluorescence staining method was done to remedy this problem.

As the fluorescence staining method brightly highlights the AFB in a dark field, and also as it is observed with the lower power objective, it is a method that can better the observation and shorten the time of observation as well.

The fluorescence staining method that was used in this experiment did a comparative analysis of the Auramine O-Rhodamine B and the Acridine Orange.

The results showed that although the Auramine O-Rhodamine B allows easier observation of the AFB with a high fluorescence expression rate for the multibacillary leprosy sample, the darkness on the periphery makes it

hard to observe anything else, while also making it hard to observe the cell changes and paucibacillary leprosy of the AFB. However, the Acridine Orange staining method highlights the cells in dark green and changes the color of the AFB from bright red to orange making it easier to observe bacilli. The results of the study show that the Acridine Orange method is superior to the Auramine O-Rhodamine B method in detecting acid fast bacilli in specimen.

Key Word : AFB, fluorescence stain, *Mycobacterium leprae*

서 론

*Mycobacterium leprae*는 항산성 간균 (Acid-Fast Bacillus)이다.¹⁾ 이 항산성은 *Mycobacterium*의 생물학적 특성으로 일반적인 세균염색에는 쉽게 염색되지 않지만 Fuchsin/phenol이 포함된 dye가 균체 세포벽에 착색된 후에는 산이나 알칼리에 의해 탈색되지 않는 성질을 말하며 Ziehl-Neelson's AFB stain이 주로 진단에 이용되어 왔다.²⁾

한편 *Mycobacterium tuberculosis*는 세계보건기구 (WHO) 의 검경판정 지침에 따라 Ziehl-Neelson's AFB stain과 동시에 fluorescence stain(Auramine)을 같이 시행해 진단에 적용하고 있다.³⁾ 따라서 본 실험에서는 *Mycobacterium leprae*에도 Ziehl-Neelson's AFB stain과 동시에 fluorescence stain을 병행하는 실험을 시행하였다.

실험에 사용된 형광염색 시약은 Auramine-Rhodamine dye가 들어있는 상품화된 *Mycobacterium tuberculosis* 진단용 염색시약 2종류 제품과 Acridine orange dye를 사용하는 형광염색법을 *Mycobacterium leprae*에 적용해 비교 실험 하였다. 실험에 사용된 검체는 본원에 내원된 환자의 조직, Mouse foot pad에 접종된 균액과 균액이 접종된 Zebra fish의 조직을 이용하였고 각각의 검체를 기존의 Ziehl-Neelson's AFB stain과 Auramine-Rhodamine dye를 이용한 fluorescence stain, Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain을 시행한 후 비교 분석 하였으며 형광염색으로 균을 관찰한 후 재확인을 위한 Ziehl-Neelson's AFB stain으로 재염색도 실시하였다.

각각의 염색법의 특이성과 간편함을 찾아 진단 검사하는 현장에 적용하여 소수의 균도 어렵지 않게 발견하는데 그 목적을 두었으며 그 결과를 보고하고자 한다.

* 교신저자 : 김종필
전자우편 : dr_jpkim@hotmail.com
주 소 : 경기도 의왕시 원골로 59
한국한센복지협회(031-452-7094)

재료 및 방법

1. 대상

한국한센복지협회 연구원에 내원한 환자 4명의 병변부위 피부 도말 검체(skin smear) 및, 피부 생검 조직 그리고, Mouse foot pad에 접종된 균액과 균액이 접종된 Zebra fish의 조직을 이용해 실험을 실시하였다. 환자들의 피부 생검 조직은 skin smear 결과 Bacterial Index(BI)가 2명이 6+, 1명은 4+였으며 1명은 2+로 판정된 조직을 사용하였고 4명 중 2명이 한국인, 2명은 외국인(파키스탄, 인도네시아)이었다.

2. 방법

환자들에 실시한 skin smear 부위와 동일한 피부에서 조직을 생검하여 파라핀 포매 블록을 만든 후 그 조직 절편을 염색하였다. Mouse foot pad에 접종된 10^9 /ml 균액으로 도말 표본을 만들어 염색하였고 Zebra fish 표본 검체는 균액 10^9 /ml를 Zebra fish의 복강 내 접종하여 16주간 배양시킨 후 Zebra fish를 통채로 파라핀 블록을 만든 후 그 조직 절편을 염색하였다.

1) Ziehl-Neelson's AFB stain

*Mycobacterium*의 항산성을 증명하는 염색법으로 염색시약은 모두 본 연구원에서 제조하여 사용하였고,¹⁾ 염색순서도 본 연구원 검사와 동일한 방법으로 시행하였다 (Table 1, 2).

Table 1. Ziehl-Neelson's AFB stain of

skin smear, Inoculum in Mouse foot pad

Step	Time
Carbol fuchsin sol (gently heat the slide)	25min
Wash(in running water)	10sec
0.1% HCL-alcohol	1min
Methylen blue sol	1min
Wash and dry	

Table 2. Ziehl-Neelson's AFB stain of skin biopsy and Zebra fish (cutting size 5~8 μ m)

Step	Time
Xylene-cast oil sol (in 37 $^{\circ}$ c water bath)	40min (2X)
Remove oil(use oil paper)	
Wash(in running water)	18min
Carbol fuchsin sol (in 37 $^{\circ}$ c water bath)	40min
Wash(in running water)	10sec
0.1% HCL-alcohol	1min
Methylen blue sol	1min
Wash and dry	
Mounting	

2) Auramine-Rhodamine dye을 이용한 fluorescence stain

형광 염료와 균체의 결합으로 Acid-Fast Bacillus를 염색시키는 방법⁴⁾으로 본 실험에서는 상품화된 BD사의 TB fluorescence stain Kit[®] T제품과 PARTEC사의 CyStain[®] TB제품을 사용하여 비교 실험하였다 (Table 3-6). 경검 시 사용된 현미경은 Olympus BX51이며 excitation 460~490nm, emission 520nm에서 검경하였다.

Table 3. BD TB fluorescence stain Kit[®]
T stain of skin smear, Inoculum
in Mouse foot pad

Step	Time
Auramine-Rhodamine T sol	25min
Wash (in running water)	10sec
Decolorizer TM	3min
Wash (in running water)	10sec
Counterstain (TB Potassium Permanganate)	5min
Wash and dry	

Table 4. BD TB fluorescence stain Kit[®]
T stain of skin biopsy and
Zebra fish(cutting size:5~8 μ m)

Step	Time
Xylene	2min (2X)
99.9% alcohol	2min (2X)
Wash(in running water)	2min
Auramine-Rhodamine T sol	25min
Wash(in running water)	10sec
Decolorizer TM	3min
Wash(in running water)	10sec
Counterstain (TB Potassium Permanganate).	5min
Wash and dry	
Mounting	

Table 5. PARTEC CyStain[®] TB stain of
skin smear, Inoculum in Mouse
foot pad

Step	Time
Staining sol	15min
Wash(in running water)	10min
Destaining sol	1min
Wash(in running water)	5min
Counterstaining sol	5min
Wash(in running water)	5min
Wash and dry	

Table 6. PARTEC CyStain[®] TB stain of
skin biopsy and Zebra fish
(cutting size: 5~8 μ m)

Step	Time
Xylene	2min (2X)
99.9% alcohol	2min (2X)
Wash(in running water)	2min
Staining sol	15 min
Wash(in running water)	10min
Destaining sol	1min
Wash(in running water)	5min
Counterstaining sol	5min
Wash and dry	
Mounting	

3) Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain

Acridine orange는 세포내의 핵산을 증명하는 염색법⁵⁾으로 염색시약은 모두 본 연구원에서 제조하여 사용하였으며, (Table 7, 8) 염색방법은 katila, Mantyjarvi에 의해 기술된⁶⁾ 형광 염색법으로 실험을 실시했다. (Table 9, 10) 경검 시 사용된 현미경은 Olympus BX51이며 excitation 460~490nm, emission 520nm에서 검경하였다.

Table 7. Acridine orange solution⁶⁾

Reagent	Vol
Phenol crystal	5g
Deionized water	50ml
Glycerol	25ml
95% alcohol	25ml
Acridine orange	0.1g
	overnight

Table 8. Destaining solution⁶⁾

Reagent	Vol
95% alcohol	74ml
Deionized water	26ml
Concentrated HCL	0.5ml
Methylen blue	0.2g

Table 9. Acridine orange fluorescence stain of skin smear, Inoculum in Mouse foot pad

Step	Time
Acridine orange solution	15min
Wash(in running water)	10 sec
Destaining solution	2min
Wash(in running water)	10 sec
Dry	

Table 10. Acridine orange fluorescence stain of skin biopsy and Zebra fish(cutting size:5~8 μ m)

Step	Time
Xylene	2min (2X)
99.9% alcohol	2min (2X)
Wash(in running water)	2min
Acridine orange solution	15min
Wash(in running water)	10sec
Destaining solution	2min
Wash and dry	
Mounting	

결 과

각각의 염색방법에 의한 결과는 아래 사진과 같다(Fig. 1~11).

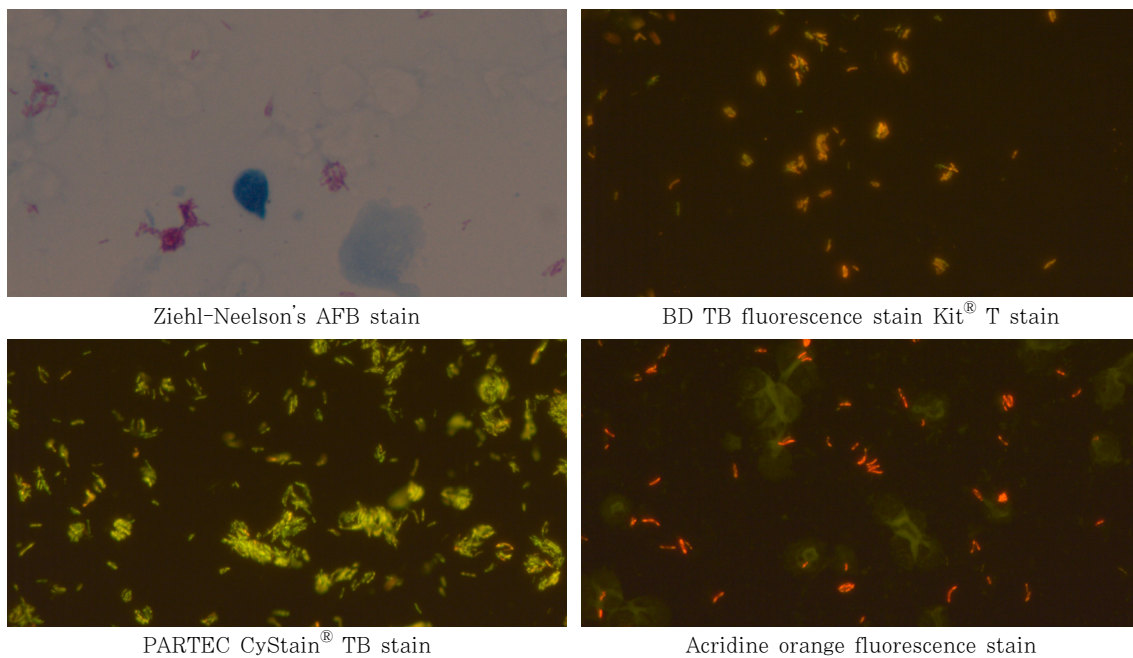


Fig. 1. Results of case 1 (BI=6) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin smear ($\times 1000$)

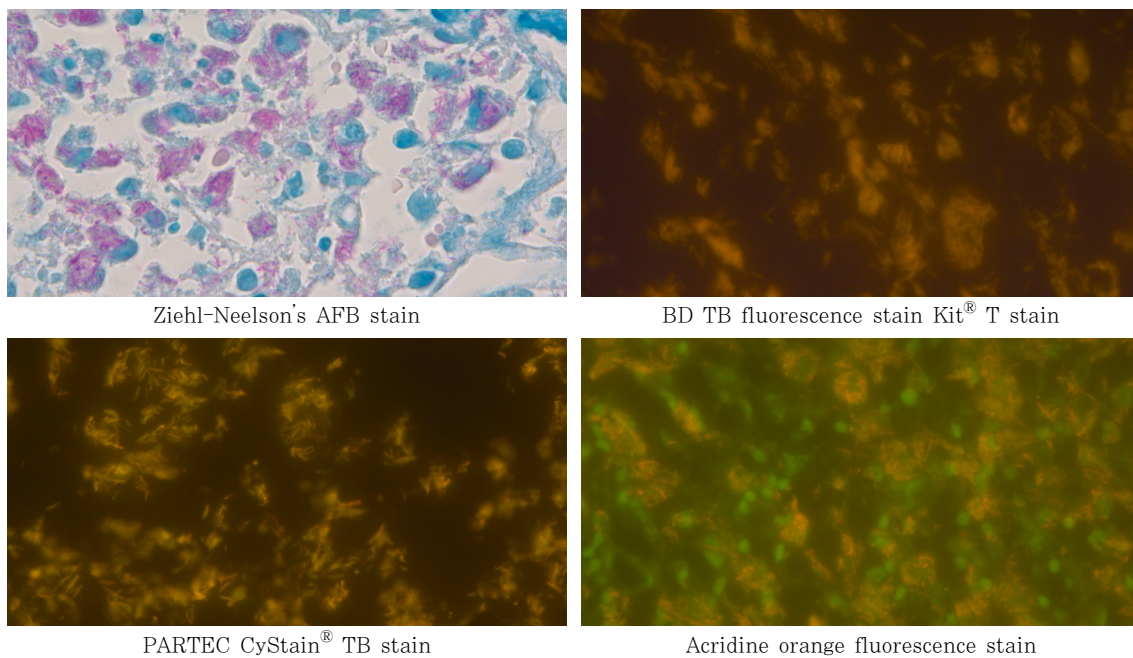


Fig. 2. Results of case 1 (BI=6) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin biopsy ($\times 1000$)

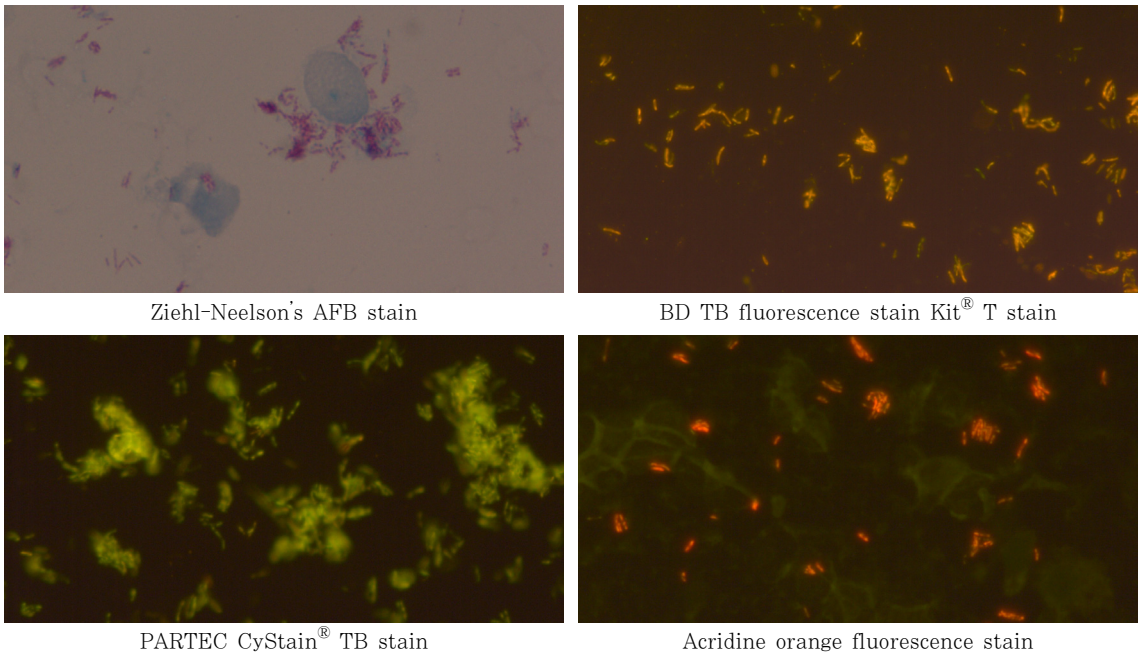


Fig. 3. Results of case 2 (BI=6) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin smear ($\times 1000$)

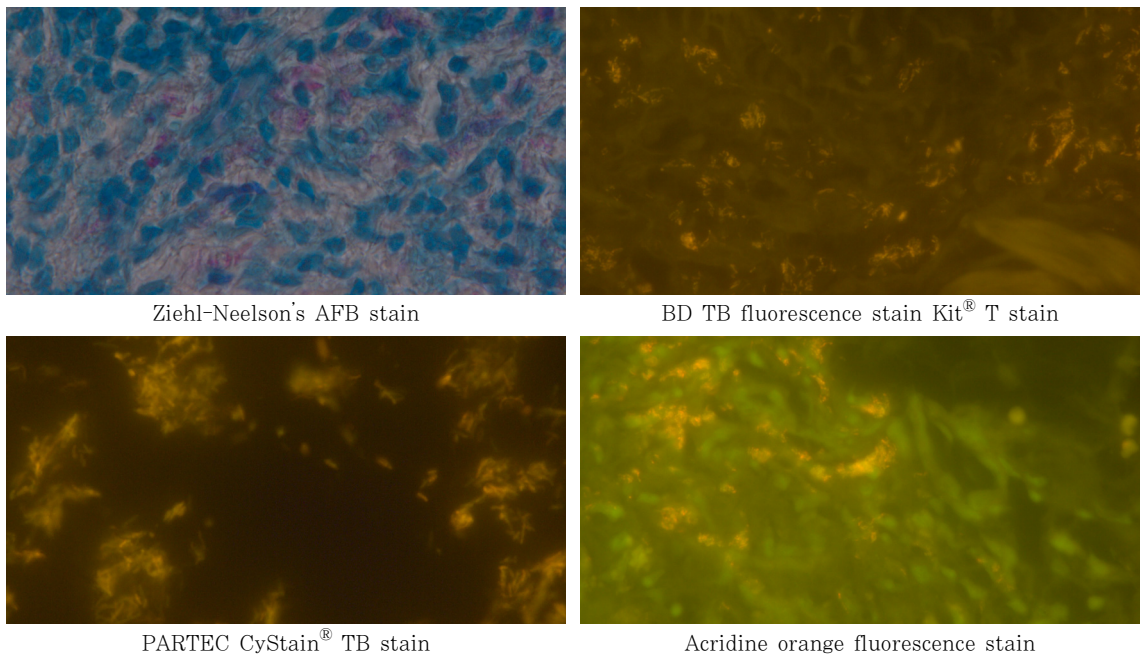


Fig. 4. Results of case 2 (BI=6) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin biopsy ($\times 1000$)

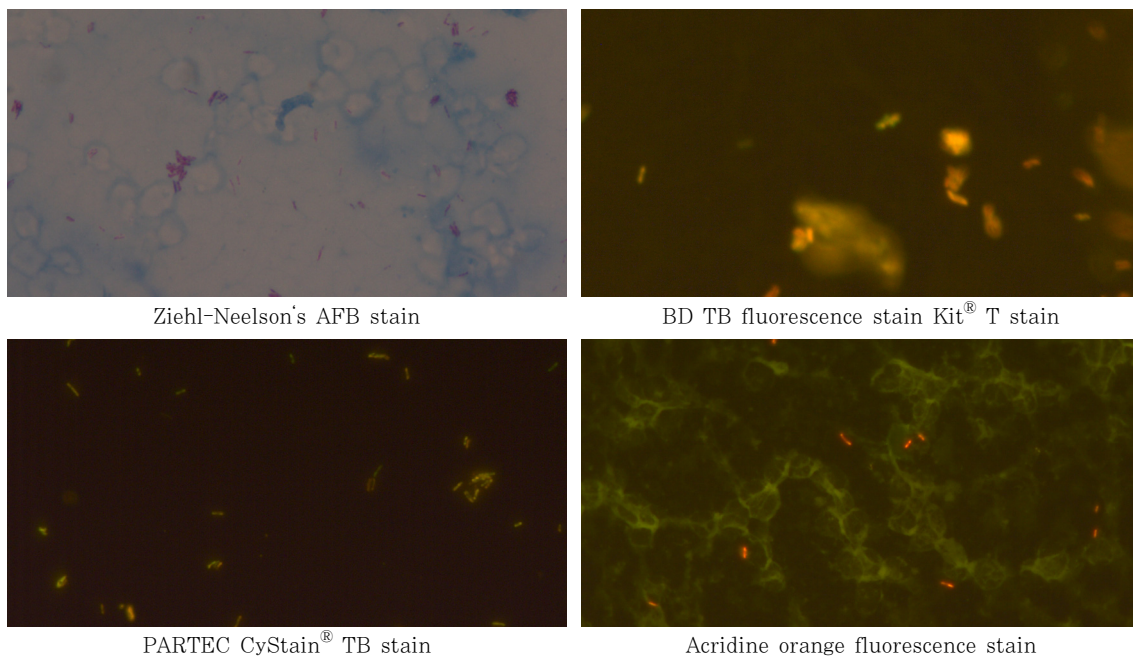


Fig. 5. Results of case 3 (BI=4) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin smear ($\times 1000$)

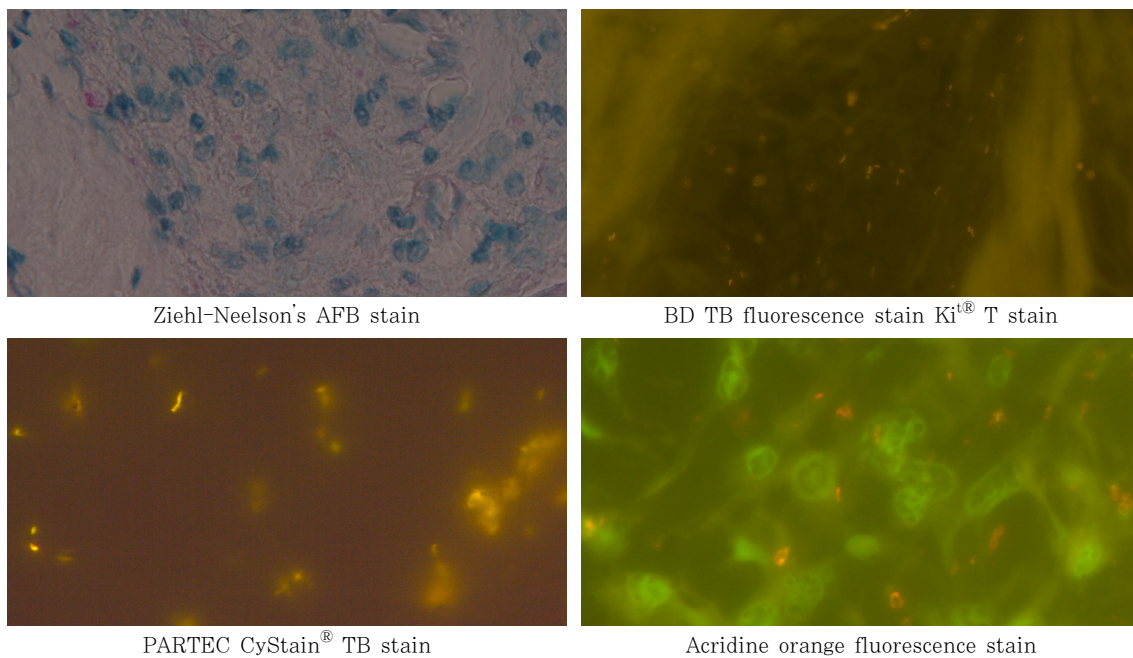


Fig. 6. Results of case 3 (BI=4) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin biopsy ($\times 1000$)

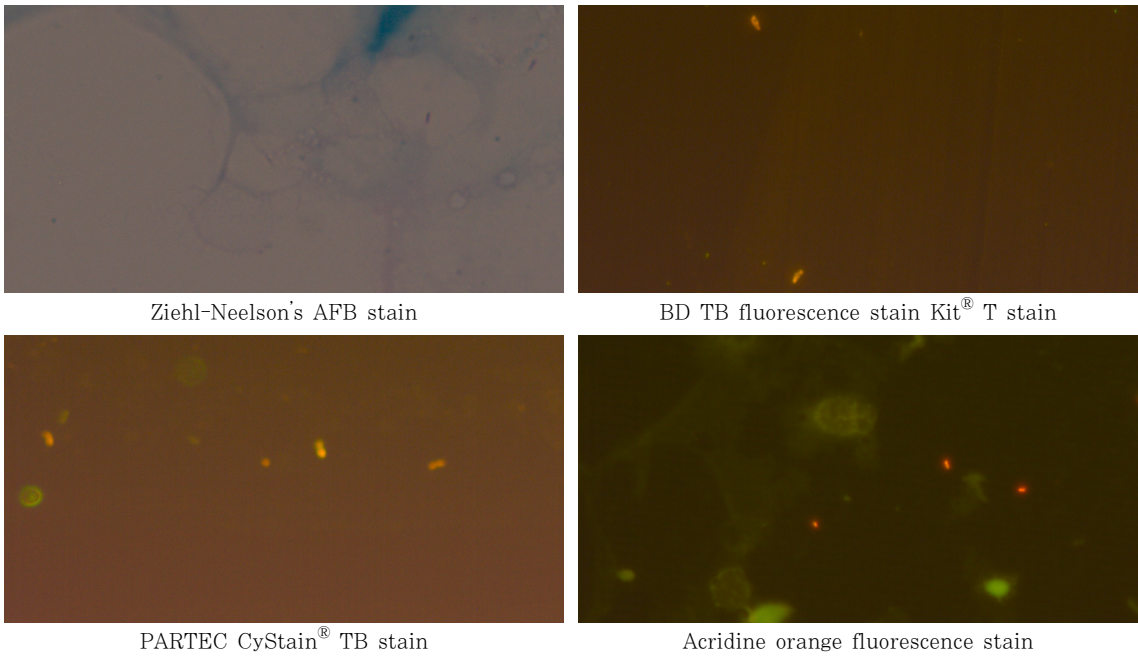


Fig. 7. Results of case 4 (BI=2) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin smear ($\times 1000$)

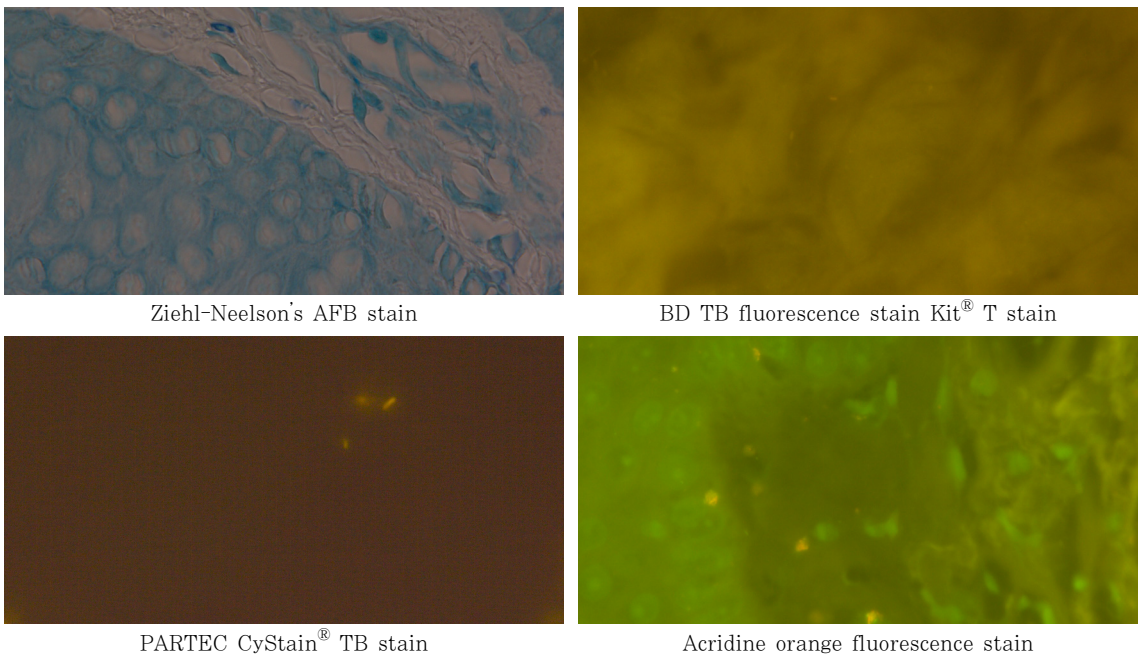


Fig. 8. Results of case 4 (BI=2) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of skin biopsy ($\times 1000$)

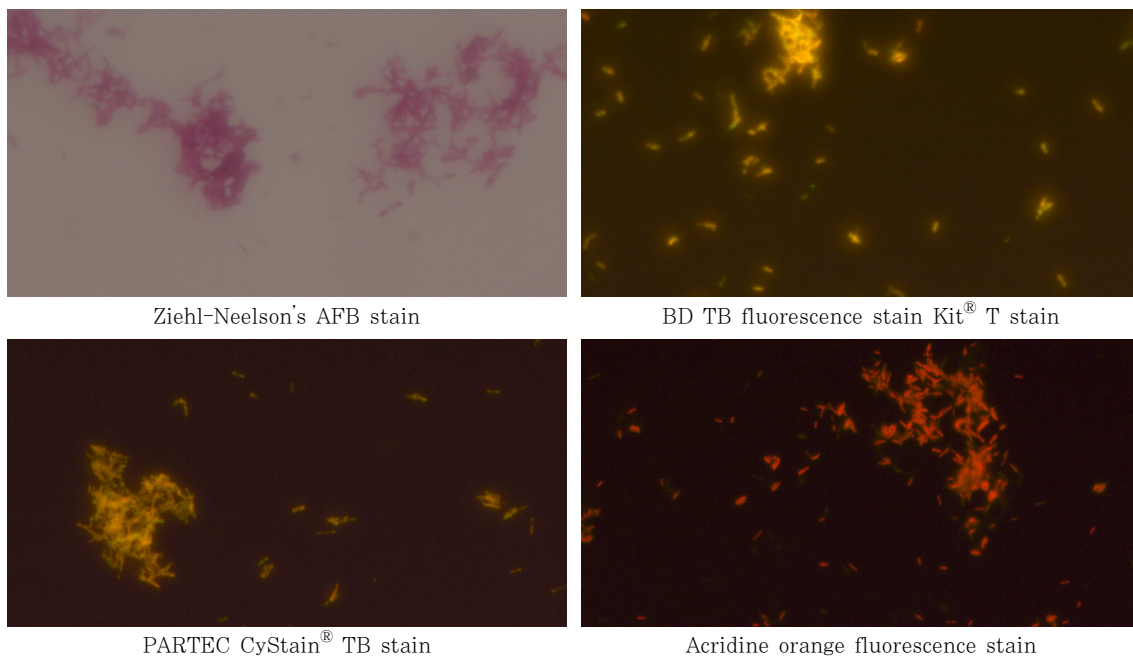


Fig. 9. Results of case 5 (Inoculum in Mouse foot pad) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of Inoculum in Mouse foot pad (×1000)

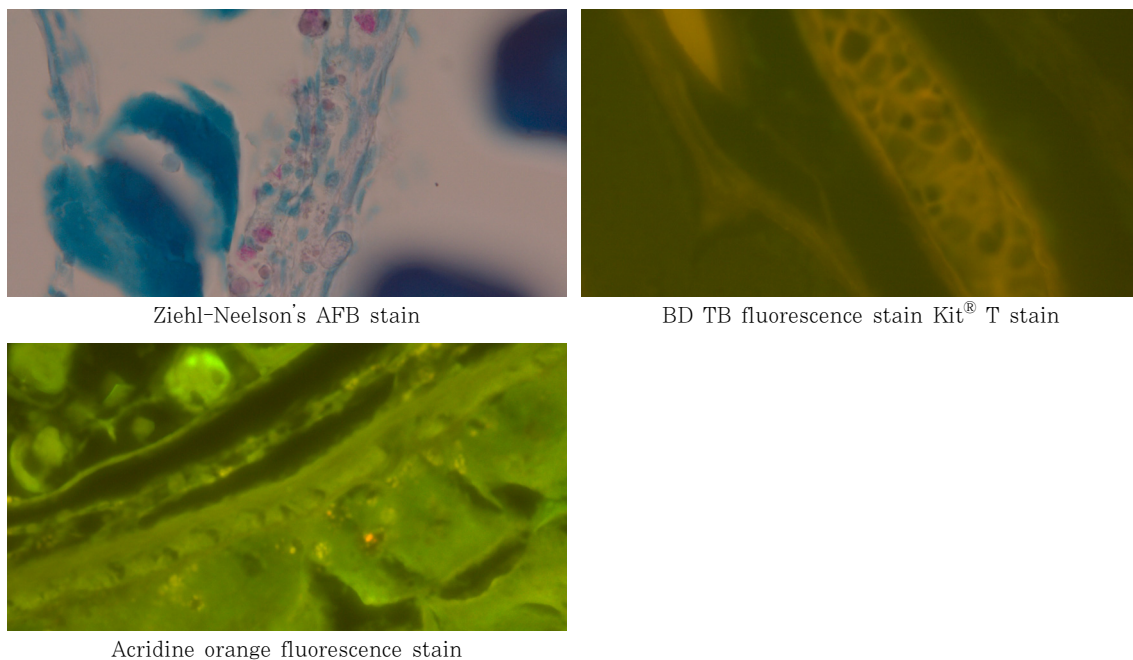
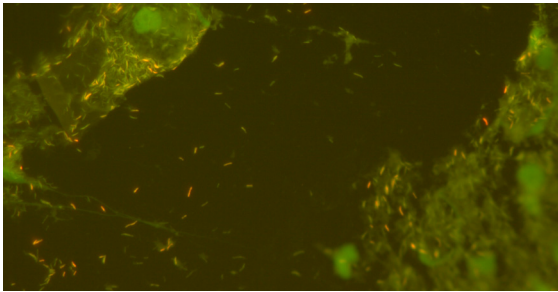
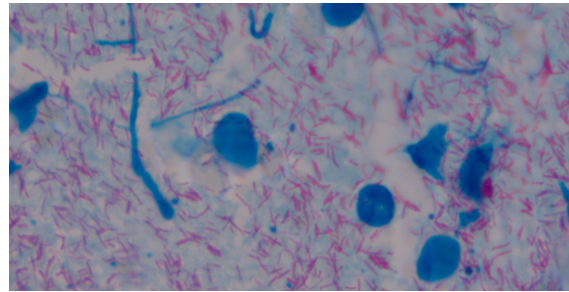


Fig. 10. Results of case 6 (Inoculated Zebra fish) : Ziehl-Neelson's AFB stain and fluorescence stain of Inoculated Zebra fish (×1000)



11-1



11-2

Fig. 11. Results of case 7 (Re-staining) : Acridine orange fluorescence staining of Inoculum in Mouse foot pad(11-1), Ziehl-Neelson's AFB staining after Acridine orange fluorescence staining of Inoculum in Mouse foot pad(11-2) (×1000)

고 찰

*Mycobacterium leprae*의 항산성을 이용한 Ziehl-Neelson's AFB stain은 진단에 필수적인 방법¹⁾으로 사용되어 왔지만 염색시 적당한 가온이 필요하고 조작에 숙련도를 요구한다. 또한 염색액을 수시로 여과해 사용해야 되며 찌꺼기가 많은 검체에서는 검경 시 배경의 이물질과 균체의 구분을 어렵게 하는 단점이 있고 특히 희균나의 경우나 장기간 치료된 환자의 검체에서는 종종 위음성 판정을 내리는 문제가 있었다. 따라서 본 연구원에서는 이러한 문제점들을 해결하여 보다 정확한 진단을 위해 기존에 Ziehl-Neelson's AFB stain 이외에 몇 가지의 형광 염색법을 시행하였다.

먼저 Auramine-Rhodamine dye를 이용한 형광 염색은 형광물질인 Auramine-O/Rhodamine-B dye가 항산성 간균(Acid-Fast Bacillus)의 세포벽 내에 있는 mycolic acid와 결합해 형광을 발하게 하는 염색법으로 HCL-alcohol에 탈색시키면 일반 세

균은 모두 탈색되고 항산성과 결합한 AFB만 형광을 발하게 된다. 다만 Auramine-Rhodamine dye를 이용한 형광 염색은 counterstain 과정에서 Potassium Permanganate가 배경조직의 형광성을 억제⁶⁾하여 배경검색이 어렵고 종종 이물질과 AFB 구별이 어려운 경우가 있었다. 이러한 점을 보완하기 위해 katila, Mantyjärvi에 의해 기술된 Acridine orange dye를 이용한 형광 염색법⁶⁾으로 비교 실험을 실시했다. Acridine orange dye를 이용한 형광 염색법은 세포내의 핵산을 증명하는 방법으로 DNA는 녹색형광을 RNA는 적색형광을 나타나게 하는데⁵⁾ 이는 phenol에 의해 AFB 균체내로 Acridine orange dye가 침투되어 균체내의 핵까지 침투되어 염색이 되고 HCL-alcohol에 탈색과 동시에 Methylene blue에 의한 대조염색까지 처리되는 염색법이다.⁶⁾ Acridine orange dye를 이용한 형광 염색법을 시행한 결과 Methylene blue에 의해 배경이 선명하게 암녹색으로 염색되어 배경검색이 용이하였고 AFB에는 선명한 orange, red yellow

green의 형광이 발견되어 검경이 간편하였다.(Fig. 1~11) 또한 두꺼운 도말이나 균이 적은 희균나에서도 쉽게 구분해 낼 수 있었으며 이물질도 거의 볼 수 없었다.(Figure 7, 8, 10) 또한, 형광염색으로 균을 관찰한 후 재확인을 위해 Ziehl-Neelson's AFB stain으로 중복염색을 실시했을 때 3개의 표본 검체 모두 재염색이 가능하였다.(Fig. 11) 하지만 반대로 Ziehl-Neelson's AFB stain을 시행한 후에 같은 표본을 형광염색 했을 때는 Auramine-Rhodamine dye, Acridine orange dye에 모두 염색이 되지 않았다.

본 실험은 제한된 시간 내에 실시하여 다양하게 많은 표본을 얻어 실험하지는 못했지만 각각의 표본선택에 신중을 기하여 의미 있는 결과를 얻을 수 있었다.

결론

본 실험은 한국한센복지협회 연구원에서 진단된 한센환자의 병변부위 피부 도말 검체 (skin smear) 및 피부 생검 조직, Mouse foot pad에 접종된 균액과 균액이 접종된 Zebra fish의 조직을 기존의 Ziehl-Neelson법과 Auramine-Rhodamine dye를 이용한 fluorescence stain, Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain을 시행한 후 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻어, 보고하고자 한다.

1. 기존의 검사법인 Ziehl-Neelson's AFB stain은 희균나, 약물 치료를 받은 환자의 검체, 두꺼운 도말 표본 등에서는 균 검출율이 낮아 위 음성 판정에

문제가 있었다.

2. Auramine-Rhodamine dye를 이용한 fluorescence stain은 다균나에서는 어느 표본이든 균 검출율이 높았으나 배경염색이 안 되어 희균나의 검경이 어려운 경우가 있었으며 특히 9 μ m 정도로 두껍게 박절된 Zebra fish 표본 검체는 AFB가 기생하는 내장의 장기 구분이 안 되어 배경의 세포성 변화를 볼 수 없었으며 어두운 배경만 유지되어 검경 자체가 어려운 경우가 있었다. 또한 염색액의 유효기간이 1개월로 짧으며 영구표본을 얻을 수 없다.
3. Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain은 희균나 및 두꺼운 도말 표본, Zebra fish 표본 검체에서도 선명하게 균체의 형광이 발견되었고 Destaining solution에 첨가된 Methylen blue로 인해 배경이 암녹색으로 염색되어 균체 관찰이 간편하였다. 탈색 및 대조염색을 one step으로 시행해서 염색시간도 단축할 수 있었다. 다만 Acridine orange dye는 돌연변이를 유발하는 발암물질로 취급에 있어서 주의를 요한다.
4. Auramine-Rhodamine dye와 Acridine orange dye에 염색된 표본은 재확인이 필요한 경우 Ziehl-Neelson's AFB stain으로 재염색이 가능하나 Ziehl-Neelson's AFB stain을 먼저 시행한 염색표본은 Auramine-Rhodamine dye와 Acridine orange dye에 재염

색이 되질 않는다.

5. 이 실험에서 실시한 Auramine-Rhodamine dye를 이용한 fluorescence stain과 Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain의 비교 실험결과 Acridine orange dye를 이용한 fluorescence stain이 *Mycobacterium leprae* 관찰에 더욱 유용하다고 사료 된다. 이에 좀 더 많은 연구 실험을 통해 방법을 보완한다면 기존의 Ziehl-Neelson's AFB stain과 fluorescence stain을 병행 실시해 *Mycobacterium leprae* 진단 검사에 많은 도움이 되었으면 한다.
6. Ronald W. Smithwick, Malcolm R. Bigbie, jr, Robert B. Ferguson et al. Phenolic Acridine orange fluorescence stain for Mycobacteria. J. clinical Microbiology 1995;33:2763~2764.
7. Jung Y S, Lee S Y. Clinical microbiology 2nd edition. Seo-heung Publisher 1993: 153~155.
8. Hong Y P, Kim S J. Tuberculosis 4th edition. Korean National Tuberculosis Association 1993:12~15.

참고문헌

1. Society of Korean Leprologists. Leprosy. Korean Hansen Welfare Association 1984 : chapter supplement II, 1984.
2. Kim S M, Kim S G, Lee K S et al. Practice of Diagnostic microbiology. Korea medical book Publisher 2001: 75~84.
3. Bae G H. Mycobacterium tuberculosis examination. Medical Publisher 2002 :33~35.
4. Korean Professor of Clinical Pathology Council, Histology&Cytology Subcommittee. Practical Histotechnology 3rd edition. Korea medical book Publisher 2009: 394~398.
5. Korean Professor of Clinical Pathology Council, Histology & Cytology Subcommittee. Histotechnology 3rd edition. Korea medical book Publisher 2009:240,

