大韓癩學會誌 : 第46卷, 第1號 2013
Korean Leprosy Bulletin,
Vol. 46, No. 1 December, 2013

나균에서의 acridine orange 형광염색

한국한센복지협회 연구원
김종필, 이민석, 강정원

Abstract

Acridine orange stain of *Mycobacterium leprae*

Jong Pill Kim, Min Seok Lee, Jeoung Won Kang

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

The Ziehl-Neelson's AFB staining method was mainly used for the AFB observation of the diagnosis of leprosy. However, the fluorescent stain performs better and allows the detection of more positive smears. The limitation for its widespread use has been the high cost for fluorescent microscopes. Novel light-emitting diodes (LED) are inexpensive solutions for fluorescent microscopes, and thus fluorescent stain may be a cost-effective step to improve the diagnosis of leprosy in resource-poor countries. And the comparison of auramine and acridine orange for staining of acid-fast bacteria was showed significantly more acid-fast rods after using acridine orange and the number of "false positive" results was somewhat higher on auramine staining. So acridine orange offers a good alternative to auramine which is considered carcinogenic.

This study evaluated the comparison of the Ziehl-Neelson's AFB stain and the acridine orange stain in the skin smear based on PCR. As PCR results were taken as gold standard, results of the study revealed that the sensitivity of Ziehl-Neelson's AFB stain was 50% and that of acridine orange stain was 92.2%. This study confirmed that the fluorescence stain method is more sensitive than the Ziehl-Neelsen's staining method. It is suggested that the training of laboratory technicians on fluorescence microscopy should be scaled up for increased disease control.

key Word : Acridine orange stain, Mycobacterium leprae

나균 (*Mycobacterium leprae*)은 항산성 간균(Acid-Fast Bacillus)이다[1]. 이 항산성은 마이코박테리움의 생물학적 특성으로 Fuchsin/phenol이 포함된 색소가 균체 세포벽에 착색된 후에는 산이나 알칼리에 의해 탈색되지 않는 성질을 말하며 Ziehl-Neelson AFB 염색이 주로 진단에 이용되어 왔다[2]. 한편 호흡기 결핵을 찾기 위한 노력으로 세계보건기구는 객담내의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 쉽게 찾기 위해 형광현미경과 같은 단순하고 정확한 진단법의 개발을 독려하고 있다[3]. 그 동안 나균에 대한 형광염색에 대한 여러 보고가 있었으나[4-8], 한센병 진단 과정에서는 형광염색을 적극적으로 활용하고 있지 않고 있고, 주로 auramine 염색을 이용한 것이다.

연구자의 사전 연구결과[9]에 따라 auramine 염색보다 acridine염색이 더 실용성이 있다고 판단하여 이에 본 연구는 나균을 AFB 염색과 동시에 Acridine orange(acridine O) 형광염색을 병행하는 실험을 시행하고 이를 재평가하기 위해 나균 DNA 검출 후 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR) 확인한 후 이에 대한 최종평가를 하고자 한다.

또한 한센병 관련 현장종사자의 검사 활용성 및 이에 대한 향후 대책 등을 알아보고자 한다. 이를 통하여 각각의 염색법의 특이성과 간편함을 찾아 보급하여 현장에서의 한센병 진단 검사에 적용하여 소수의 균도 어렵지 않게 발견함으로써 효과적인 한센병 발견사업의 증진을 목적으로 한다.

재료 및 방법

1. 대상

2013년 4월 1일 부터 8월 30일까지 한국한센복지협회 연구원에 내원한 한센사업 대상자(환자 및 한센서비스대상자) 중 병변부위 피부도말(skin smear) 검체를 실시한 자를 대상으로 한다.

2. 방법

2013년 4월 1일 부터 8월 30일까지 한국한센복지협회 연구원에 내원한 한센사업 대상자들에 대해 피부도말 검사를 실시하여 슬라이드에 도말 후 acridine O색소를 이용한 형광염색, Ziehl-Neelson AFB 염색, 나균 DNA 검출 후 PCR 순으로 검사를 실시한다.

1) Acridine orange 색소를 이용한 형광염색

Acridine orange는 세포내의 핵산을 증명하는 염색법으로 염색시약은 Smithwick[10] 등에 의한 phenolic acridine orange방법으로 모두 본 연구원에서 제조한 시약을 사용하였으며(Table 1, 2), 염색방법도 이에 의한 방법으로 형광 염색법으로 실험을 실시

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

했다. (Table 3) 검경 시 사용된 현미경은 CyScope® PH(Partec, Görlitz, Germany) 이며 excitation 455nm에서 검경하였다.

Table 1. Phenolic acridine orange solution

Reagent	vol
phenol crystal	5g
Deionized water	50ml
Glycerol	25ml
95% alcohol	25ml
Acridine orange	0.1g

Table 2. Destaining solution

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

Table 3. Phenolic acridine orange fluorescence stain of skin smear

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

2) Ziehl-Neelson's AFB 염색

Acridine O염색한 슬라이드를 형광현미경으로 검경한 후 동일한 슬라이드로 AFB 염색을 실시한다. 이를 위해 acridine O염색한 슬라이드에 대해 AFB 염색을 위한 전처리를 실시한다. 전처리가 끝난 후 AFB 염색을 실시한다. AFB염색은 마이코박테리아의 항산성을 증명하는 염색법으로 염색시약은 모두 본 연구원에서 제조하여 사용하였고, 염색순서는 본 연구원에서 최근 시행하고 있는 방법과 동일한 방법으로 시행하였다(Table 4, 5)

Table 4. Pre-treatment for AFB's stain of fluorescence stained slides

Step	Time
Xylene	2 min
100% alcohol	2 min
wash (in running water)	2 min
Drying	30 min

Table 5. Ziehl-Neelson's AFB stain of skin smear

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

3) 나균 DNA 분리 후 PCR

Acridine O 염색 후 AFB 염색한 슬라이드에 대해 나균 DNA 검출 후 PCR을 위한 전처리를 실시한다. 전처리 과정은 acridine O염색한 슬라이드에 대해 AFB 염색을 위한 전처리 방법과 동일하게 실시한다. 전처리가 끝난 후 PCR을 위한 나균 DNA 검출을 실시하였다. 20ml 용기에 슬라이드를 넣고 Qiagen사의 ATL buffer (추정 조성: Tris-HCl 100mM, NaCl 200mM, SDS 0.2%, EDTA 5mM) 15ml을 부은 후 56℃에서 12시간 처리한 후 QIAamp DNA Investigator Kit를 이용하여 QIAcube를 이용하여 나균 DNA를 분리하였다.

PCR은 시발체는 Primer-BLAST를 이용하여 나균 RLEP4(X17152.1)에 대한

시발체(Table 6)를 제작하여 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 95℃ 30초, 59℃ 30초, 72℃ 30초 28회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 QIAxcel을 이용하여 전기영동하여 원하는 밴드 여부를 확인하였다.

Table 6. Profile of primers

	Sequence(5'_>3')	length	Start	Stop	Tm	GC%
forward	ACCATTTCTGCCGCTGGTAT	20	26	45	59.74	50.0
reverse	ATCTGCGCTAGAAGGTTGCC	20	179	160	60.46	50.0
Product length 154bp						

4) 형광염색 실용성 평가

Acridine O형광염색법의 실용성 평가를 위해 보건 관계 전문인 집단(임상병리사 10명, 피부과 수련의사 4명)에 대해 염색결과 판독여부 및 판독시간 등을 평가한다. 검사자는 관련업무 종사 년수를 기준으로 5년 이내, 6년에서 20년, 20년 이상으로 3집단으로 구분하여 평가하였다. 평가를 위한 균의 밀도는 세균지수가 2(BI=2)인 시료를 이용하여 acridine O염색 및 AFB 염색 슬라이드를 사전 제작하여 결과에 대한 사전 정보없이 검경시켰다.

판독여부는 5분을 기준으로 하였고 그 이하인 경우는 판독 시까지 소요된 시간을 측정하여 이를 자료로 활용하였고, 5분 이상 소요 시 실패한 것으로 판정하였다. Acridine 염색 슬라이드 검경 시는 피조사자의 전혀 도움을 주지 않은 경우와 도움을 주는 경우의 두 단계로 과정을 나누어 실시하였다.

결 과

1. 조사 대상자

2013년 4월 1일 부터 8월 30일까지 한국한센복지협회 연구원에 내원한 한센사업 대상자들에 대해 skin smear를 실시하여 슬라이드에 도말 후 Acridine orange 색소를 이용한 형광염색, Ziehl-Neelson 염색, 나균 DNA 검출 후 PCR 순으로 검사를 실시한 대상자는 109명으로 남자가 69명, 여자가 40명으로 이들의 평균나이는 62.8세이었고, 다균형이 74명, 희균형이 35명이었다.

1) Acridine orange 색소를 이용한 형광염색 및 Ziehl-Neelson's AFB 염색

Acridine O염색결과 109예 중 34예에서 형광현미경 검경으로 균이 확인되었으며, Ziehl-Neelson's AFB 염색한 슬라이드를 형광현미경으로 검경한 후 동일한 슬라이드로 AFB염색 결과는 109예 중 16예에서 현미경 검경으로 균이 확인되었다(Fig.1-4).

2) 나균 DNA 분리 후 PCR

Acridine O 염색 후 AFB 염색한 슬라이드에 대해 나균 DNA 검출 후 PCR 결

과 109예 중 28예에서 전기영동 상 의미 있는 밴드가 확인되었다.

3) 염색방법 및 PCR에 따른 비교

Acridine O염색 후 AFB 염색한 결과를 분석하여 보면 Acridine O염색에서 양성인 34예에서 AFB 염색은 15예가 양성(44%)이 확인되었고, AFB 염색에서 양성인 16예에서는 15예(93.8%)에서 Acridine O 염색이 양성으로 확인되었다(Table 7).

Table 7. Result of Acridine O stain & AFB stain

		AFB		
		pos.	neg.	total
Acridine O	pos.	15	19	34
	neg.	1	74	75
	total	16	93	109

Acridine O염색 후 AFB 염색한 슬라이드에 대해 나균 DNA 검출 후 PCR 결과를 분석하여 보면 Acridine O염색의 경우는 34예의 양성자에서 26예(76.5%)에서 PCR 상 의미 있는 밴드가 확인되었고, PCR 검사 상 의미 있는 밴드가 확인된 28예 중 26예(92.9%: 민감도, 90.1% 특이도, PCR 검사 상 의미 있는 밴드가 확인된 경우를 기준(gold standard)으로 고려할 때)가 Acridine O염색에서 양성으로 확인되었다(Table 8). 반면, AFB 염색의 경우는 16예의 양성자에서 14예(87.5%)에서 PCR 상 의미 있는 밴드가 확인되었고, PCR 검사 상 의미 있는 밴드가 확인된 28예 중 14예(50%: 민감도, 100% 특이도, PCR 검사 상 의미 있는 밴드가 확인된 경우를 기준(gold standard)으로 고려할 때)가 AFB 염색에서 양성으로 확인되었다(Table 9).

Table 8. Result of PCR & Acridine O stain

		PCR		
		pos.	neg.	total
Acridine O	pos.	26	8	34
	neg.	2	73	73
	total	28	81	109

Table 9. Result of PCR & AFB stain

		PCR		
		pos.	neg.	total
AFB	pos.	14	0	16
	neg.	14	2	93
	total	28	81	109

4) 형광염색 실용성 평가

Acridine O형광염색법의 실용성 평가를 위해 보건 관계 전문인 집단(임상병리사 10명, 피부과 수련의사 4명)에 대해 염색 결과 판독여부 및 판독시간 등을 평가하였는데, 관련업무 종사 년수를 기준으로 5년 이내 종사자는 7명(임상병리사 3명, 피부과 수련의사 4명), 6년에서 20년 종사자는 3명(임상병리사 3명), 20년 이상 종사자는 4명(임상병리사 4명) 등이 평가에 참여하였다.

AFB 염색에 대한 검경 평가에서 5년 이내 종사자는 7명 중 5명(71.4%)은 5분이내(평균 2.5분)에, 6년에서 20년 종사자는 3명 중 3명(100%), 20년 이상 종사자는 4명 중 4명(100%)은 5분이내(평균 4분, 3.5분) 판독하였다 (Table 10).

Table 10. Result of reading of AFB stain

		< 5years	6-20 years	>20years
AFB	mean time(min.)	2.5	4	3.5
	success rate(%)	71.4	100	100

Acridine O염색에 대한 검경 평가에서 피조사자의 도움을 주었을 경우 5년 이내 종사자는 7명 중 100명(71.4%)은 5분이내(평균 2.67분)에, 6년에서 20년 종사자는 3명 중 2명(66.7%), 20년 이상 종사자는 4명 중 3명(75%)은 5분이내(평균 2.5분, 2.33분) 판독하였다(Table 10). 반면에 피조사자의 도움을 전혀 주지 않을 경우 5년 이내 종사자는 7명 전원이 5분이내 판독하지 못하였고, 6년에서 20년 종사자는 3명 중 1명(33.3%), 20년 이상 종사자는 4명 중 1명(25%)은 5분이내(평균 5분) 판독하였다(Table 12).

Table 11. Result of reading of Acridine O stain with help

		< 5years	6-20 years	>20years
Acridine (+H)	mean time(min.)	2.67	2.5	2.33
	success rate(%)	100	66.7	75

Table 12. Result of reading of Acridine O stain without help

		< 5years	6-20 years	>20years
Acridine (-H)	mean time(min.)		5	5
	success rate(%)	0	33.3	25

고 찰

결핵균 발견을 위해 Ziehl-Neelson 염색과 형광염색이 전통적인 염색법으로 사용할 수 있으나[11], 간편성과 비용적 측면에서 Ziehl-Neelson 염색은 세계적으로 특히 개도국에서 많이 사용하고 있다[12]. 그러나 auramine형광염색이 Ziehl-Neelsen 염색에 비해 높은 민감도와 판독 시간 절약의 장점에 대한 여러 보고가 있다[13-16]. Tenover 등[17]은 최근 형광염색을 전통적인 Ziehl-Neelson 과 함께 사용하는 것을 검사의 시간을 줄이기 위해 권장하고 있고, Ulukanligil 등[16]은 형광염색은 시간 및 비용 관점에서 매우 경제적이어서 특히 많은 검사를 시행하는 곳에서는 사용이 권장되고 있다.

다만 검사 종사자의 형광염색에 대한 숙련도가 위양성이나 음성 결과를 예방하는데 중요하다. 그래서 항산균 검사의 검증 받은 종사자가 확보될 때까지, 두 가지 검사를 동시에 시행하고, 형광염색에 익숙해 지면, 형광염색을 기본으로 하는 방법을 제안하였다. Auramine 형광염색은 비록 기존의 fuchsin 색소 사용에 비해 관찰 시간을 절약할 수는 있기는 하지만, 사용 상 여러 어려움이 있다고 알려져 왔다는데, Ziehl-Neelson 재염색을 통해 예방할 수 있다고 보고되고는 있지만, 특히 형광조각들이 항산균으로 오인될 수 있고[18,19], 배경 형광이 potassium permanganate에 의해 억제되어 항산균을 찾기 위한 배경 물질을 보기가 어려운 문제가 있다[20].

Auramine orange 염색은 1938년 Hageman에 의해 처음 소개된 이후 항산균에 대한 형광염색에 사용하고 있다고

Richards 등[21]이 보고하였다. Katila과 Mantyjarvi[22]는 색소로서 acridine orange을 사용한 형광염색을 평가하였는데, 이 방법은 prestaining acidification 단계가 필요하고, phenol은 물론 barbital을 포함하지 않는 염색 시약을 사용하여, 약 단지 2주간 사용할 수 있다.

Smithwick 등[10]에 의해서 acridine orange를 사용하는 새로운 항산균에 대한 형광염색이 소개되었다. acridine orange 염색 시약과 탈색 대조염색 시약 등 단지 두 가지의 시약을 사용한다. auramine염색에 비해 붉은색에서 주황색의 항산성 균을 찾기 위한 옅은 녹색의 배경으로 비항산성 조각들의 비특이 염색이 덜 나타나, acridine orange염색이 auramine염색보다 더 우월하다고 보고하였다. 또한 이 새로운 acridine orange 형광염색은 마이코박테리아의 세포벽을 통한 색소 투과를 증진시키기 위해 전통적인 항산균 염색에서와 같이 phenol을 사용하며, 6개월 정도 사용이 가능하다.

Acridine orange 염색된 항산균은 밝은 적색에서 오렌지색으로 형광을 보이고, acid-alcohol 탈색 용액의 methylene blue는 비항산성 조각을 투과광 현미경에서 볼 수 있게 옅은 파란색으로 염색한다. 형광현미경에서는 methylene blue는 배경 조각들의 형광성을 차단하기는 하지만, 밝은 적색 형광의 항산균을 찾기 위한 옅은 녹색 형광 배경으로 보이기 때문에, 항산균이 비교적 쉽게 보인다. 붉은 형광성 조각은 거의 보이지 않아 쉽게 항산균을 찾게 해준다.

염색된 슬라이드를 어두운 곳에 보관할 경우 acridine orange 염색된 항산균의 형광 강도는 몇 일 간 안정성을 갖는다. acridine orange 염색을 확인한 마이코박테리아는 *M. tuberculosis complex, M. avium complex, M. leprae* 등이다. Kalich 등[23]은 마이코박테리아 염색에서의 acridine orange 염색과 auramine염색의 효율성 비교에서 acridine orange 염색이 좀더 의미가 있었으며, 위양성도 적게 나타나 민감도 및 특이도가 높다고 보고하였다.

마이코박테리아 배양액을 이용한 마이코박테리아를 찾기 위한 acridine orange 염색과 auramine염색에 대한 Katila등[24]의 비교연구에서 7%에서 양성이었으며, acridine orange에서 위양성 및 위음성이 보고되지 않아 신속한 세균학적 검사로 발암성이 있는 auramine염색의 좋은 대치방법으로 acridine orange 염색을 제안하였다.

최근 인도에서 결핵환자의 객담에서 결핵균에 대한 연구에서 염색방법에 대한 비교연구에서 배양 결과를 기준(gold standard)으로 하였을 때, 민감도는 phenolic acridine 염색은 79.7%로 Ziehl-Neelson염색 83.5%로 비슷하였으나, rhodamine-auramine염색(73.4%)에 비해 보다 높게 확인되었다[25].

한센병에서도 형광염색에 대한 보고가 있다[4-8]. Fite-Farraco 염색에서 음성으로 나온 한센병 65개의 조직슬라이드 중 한 예를 제외하고 Auramine염색에서 양성을 확인하였다[6]. Bhatia 등[7]은 한센병의 피부도말 슬라이드에서의 Ziehl-Neelsen 염색과 auramine 형광염색의 비교에서 auramine 형광염색이 더 민감하였고, 적은 수의 나균의 확인에 유용하였으며, 검시자 간의 판독 오차도 적었다고 보고하였다.

Nayak 등[8]은 형광염색과 변형된 Fite-Faraco법으로 조직내의 나균을 확인하여 보았는데, 59예의 조직생검에서 Fite-Faraco

법 경우는 25예에서 확인된 반면 형광염색은 39예에서 확인되었다. 특히 희균형에서 장점을 가진다고 보고하였다. 형광현미경은 환자를 스크리닝할 때 쉽고 빠르며, 종사자의 피로를 줄일 수 있다. 세균지수가 좀더 높게 나왔다[8].

부족한 검사실 장비와 인적 자원은 결핵의 현미경학적 진단을 어렵게 하는 요인이다[26]. 많은 자원이 부족한 국가에서 결핵 진단은 Ziehl-Neelsen염색에 기초하고 있다. 그러나 auramine형광염색은 좀더 높은 양성률을 가지고 있다고 알려져 있다. 그럼에도 단지 200-300시간 정도 사용할 수 있는 비싼 광원의 교체 비용 등으로 광원형광현미경 사용의 높은 비용 때문에 이를 폭넓게 사용하지 못하고 있다.

새로운 LED는 1만 시간 이상 사용할 수 있고 비싼 광원에 대한 대치용품으로 사용할 수 있다. 형광현미경의 비교적 비싸지 않은 해결책인 LED 형광현미경을 현재 사용할 수 있으므로, 결핵 진단을 증진시키기 위한 비용효과가 있는 방법으로 형광염색이 추천된다[27]. LED 형광현미경은 기존의 mercury vapour 램프 형광현미경에 비해 적은 비용은 물론 여러 요인에서 매력적인 대치품으로 사료된다[28]. CyScope®(Partec, Görlitz, Germany) 는 발광다이오드(LED)를 광원으로 사용하는 새로운 세대의 형광현미경이다.

Excitation은 높은 출력의 Royal Blue LED (파장 455 nm)를 사용하고 transmitted light는 백색 LED 형광을 사용한다. 또한 일반 전원을 사용할 수도 있고 내장 충전 건전지를 사용할 수도 있는 장점이 있다. 또한 낮은 가격에 불구하고 LED 형광현미경은 표준적인 수은증기램프를 사용하는 형광현미경과 같은 결과가 있다고 알려져 있다[29]. 마이코박테리아에 대한 AFB 염색에 대한 대안으로 CyScope® 를 이용한 형광염색 방법에 소개되어있다[30-34] .

본 조사에서는 형광염색으로 균을 관찰한 후 재확인을 위해 Ziehl-Neelson's AFB 염색으로 중복염색을 실시했을 때 검체 모두 재염색이 가능하였지만, 하지만 반대로 Ziehl-Neelson's AFB 염색을 시행한 후에 같은 표본을 형광염색 했을 때는 Auramine-rhodamine 색소 및 Acridine orange 색소 모두 염색이 되지 않았다는 보고[9]에 따라 Acridine orange 색소를 이용한 형광염색, Ziehl-Neelson's AFB 염색, 나균 DNA 검출 후 PCR 순으로 검사를 실시하였다.

Acridine O염색 후 AFB 염색한 결과를 분석하여 보면 Acridine O염색에서 양성인 34예에서 AFB 염색은 15예가 양성(44%)이 확인되었고, AFB 염색에서 양성인 16예에서는 15예(93.8%)에서 Acridine O 염색이 양성으로 확인되었는데, 이는 Acridine O염색법이 AFB 염색에 비해 좀더 민감한 염색법으로 사료된다. 또한 PCR 검사상 의미있는 밴드가 확인된 경우로 기준(gold standard)으로 고려할 때, Acridine O염색은 민감도는 92.8%로 특이도는 90.1%로, AFB 염색은 민감도 50%, 특이도는 100%로 현장에서의 활용도 면에서 Acridine O염색이 의의가 있다고 사료된다.

AFB 염색의 경우 종사연수가 긴 경우에서 조금 판독 성공률에서 높게, 평균 판독시간은 그 반대로 나타났는데, 이는 그간 우리나라에서 한센병 진단 검사의 중요한 기준이 AFB 염색 후 검경이어서 오랜 근무로 그 전문성에 있어 성공률이 높았을 것으로

사료되고, 평균 판독 시간은 대상수가 적어서 그 의미를 부여하기는 어려울 것으로 사료된다. Acridine 염색의 경우 피조사자의 도움이 판독 성공률에 많은 영향을 미치는 것으로 나왔으며, 그 성공률이 종사기간에 크게 영향받지 않은 경향이 관찰되었는데, 이는 그 동안 사용하여 보지 않은 형광현미경에 대한 적응에 따른 문제로 사료된다.

조사 종료 후 실시한 대면 조사에서 조사 참여자의 보편적인 의견이 장비의 적응 문제로 처음 초점 및 슬라이드 위치 찾기가 어려우나, 일단 이 문제가 해결되면 검경은 기존의 AFB염색보다 쉬웠다는 것이 이를 설명할 수 있을 것 같다. 특히 본 조사에서는 최근 보급되고 있는 저가의 LED 형광현미경의 현장에서의 사용 실용성 판단을 위해 형광염색 및 AFB 염색의 검경에 사용함으로써 기존의 고가의 현미경에 준하는 검사를 수행할 수 있음을 확인하였다.

본 조사 실험은 제한된 기간 내에 실시하여 다양하게 많은 사료에 대해 실험하지는 못했지만, 시료 내의 나균 검경을 위해 phenolic acridine orange형광염색은 그간의 AFB 염색의 한계를 보완할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 본 실험에서 수행한 acridine orange 색소를 이용한 형광염색, Ziehl-Neelson's AFB 염색, 나균 DNA 검출 후 PCR 순으로 검사의 일련의 복합검사방법은 한센병 신환자 발견에 매우 유용할 것으로 사료된다.

특히 최근 들어 발광다이오드(LED)를 광원으로 사용하는 새로운 세대의 형광현미경인 CyScope®는 비교적 저가임에도 불구하고 그 성능은 기존의 고가의 형광현미경과 비슷한 성능을 가지고 있고 전기가 보급되지 않은 지역에서는 내장 충전 건전지로도 검경이 가능하기 때문에 복합적으로 검사할 수 없는 한센병 고유병 지역에서는 임상증상과 함께 Acridine O 형광검사를 병행하면 효율적인 한센사업이 가능할 것으로 사료된다. 다만 이에 대한 현장 종사자의 교육이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

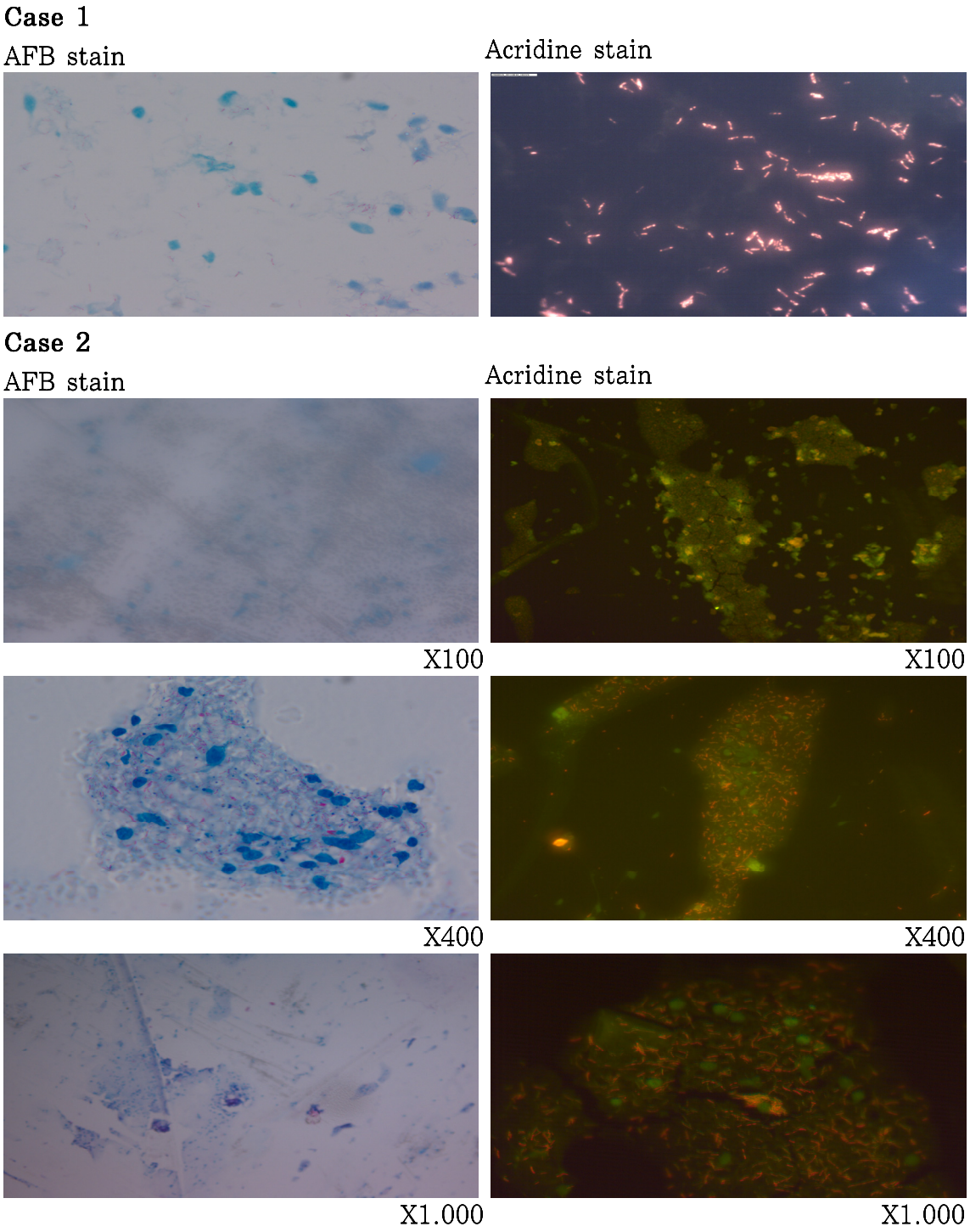
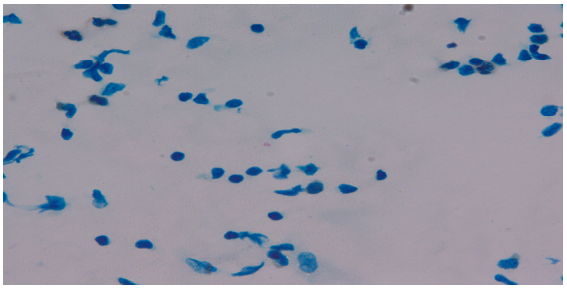


Fig.1. Result of AFB stain(+) & Acridine stain(+) case

Case 1

AFB stain



Acridine stain

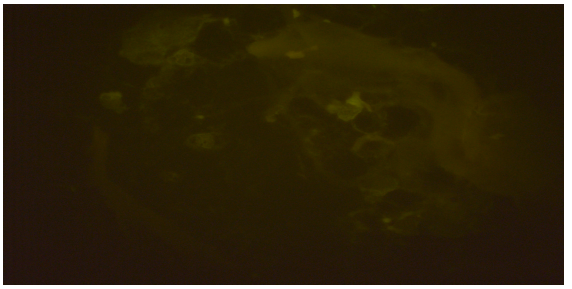
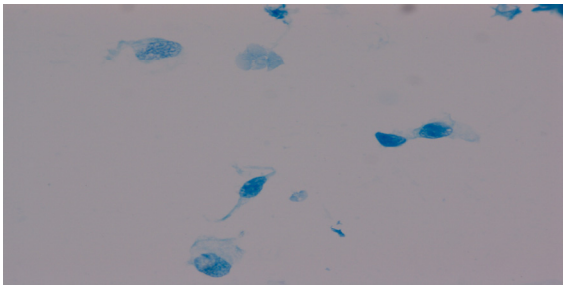


Fig. 2. Result of AFB stain(+) & Acridine stain(-) case

Case 1

AFB stain



Acridine stain

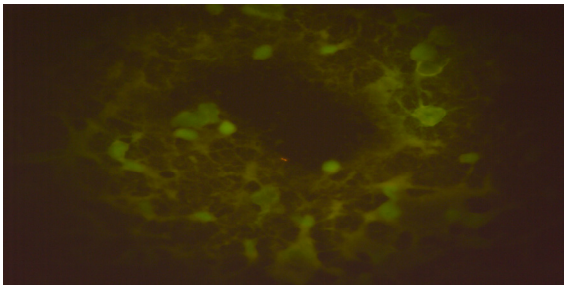
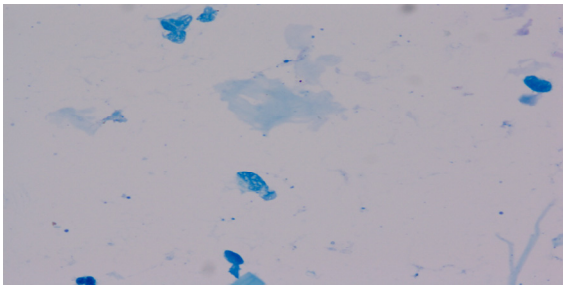


Fig. 3. Result of AFB stain(-) & Acridine stain(+) case

Case 1

AFB stain



Acridine stain

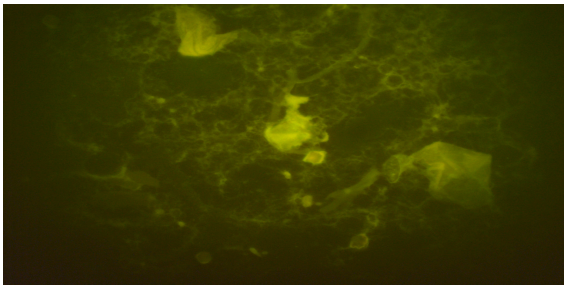


Fig. 4. Result of AFB stain(-) & Acridine stain(-) case

참고 문헌

1. Society of Korean Leprologists : Leprosy : Korean Hansen Welfare Association 1984:chapter supplement II
2. Kim S M, Kim S G Lee K S at al : Practice of Diagnostic microbiology : korea medical book Publisher 2001: p75~84
3. Getahun H, Harrington M, O'Brien R, et al. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource constrained settings: informing urgent policy changes. Lancet 2007;369: 2042-2049
4. Lopes de Faria L. Fluorescent staining for Mycobacterium leprae in tissue sections. Comparison with Fite-Faraco procedure. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1974;42(1):52-54
5. Jariwala HJ, Kelkar SS. Fluorescence microscopy for detection of M. leprae in tissue sections. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1979;47(1):33-36
6. Bhatia VN, Rao S, Saraswathi G. Auramine staining in histopathology sections. Indian J Lepr. 1987;59(4): 386-389
7. Bhatia VN, Cherian E, Harikrishnan S. Auramine staining in detecting small number of bacilli in skin smears. Indian J Lepr. 1988;60(1): 13-16
8. Nayak SV, Shivarudrappa AS, Mukkamil AS. Role of fluorescent microscopy in detecting Mycobacterium leprae in tissue sections. Ann Diagn Pathol. 2003 ;7(2):78-81
9. Kim YS, Lee HK, Lee MS, et al. Comparative analysis of Fluorescence stain and Ziehl-Neelsen's AFB stain for Mycobacterium leprae(pilot study). Korean Leprosy Bullet 2012;45:22-32
10. Smithwick RW, Bigbie MR, Ferguson RB, at al: Phenolic Acridine orange fluorescence stain for Mycobacteria.J. clinical Microbiology 1995;33:2763-764
11. Nagpaul DR District tuberculosis control programme in concept and outline. Ind J Tubercle 1967;14:186
12. Guthie W, Kitui F, Juma ES, Obvana DO, Mwai J, Kwamanga D A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl- Neelsen method in the diagnosis of pulmoner tuber- culosis. East Afri Med J 1993;70:263-266
13. Lempert H. Fluorescence microscopy in the detection tubercle bacilli. Lancet 1944; 2:818
14. Boyd JR, Marr JJ. Decreasing reliability of acid fast smear techniques of detection of tuberculosis. Ann Intern Med 1975;82:487
15. Janda WM. Mycobacteria. In EW Koneman, SD Allen (eds), Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed., JB Lippincott Co., Philadelphia, 1997. p.893-949
16. Ulukanligil M, Aslan G, Tasçi S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. Mem Inst Oswaldo Cruz.

2000;95(6):855-858
17. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J Clin Microbiol 1993;31:767-770
18. Holst E, Mitchson DA, Radhakrishna S. Examination of smears for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Ind J Med Res 1959;47:495
19. Heifets L. Mycobacteriology laboratory. Clin Chest Med 1997;18:35-41
20. Smithwick, RW, David HL. Acridine orange as a fluorescent counterstain with the auramine acid-fast stain. Tubercle 1971;52:226-231
21. Richards OW, Kline EK, Leach R. Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Am. Rev. Tuberc. 1941;44:255-266
22. Katila ML, Mantyjarvi RA. Acridine orange staining of smears for demonstration of Mycobacterium tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 1982;1:351-353
23. Kalich R, Bennert G, Fiedler T, et al. Comparison of auramine-rhodamine B and acridine orange for staining of acid-fast bacteria. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1979;23:307-317
24. Katila ML, Mäntyjärvi RA. Acridine orange staining of smears for demonstration of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol. 1982;1(6):351-3
25. Sethi S, Chatterjee SS, Bedi C, Sharma M. Evaluation of Acridine Orange staining for rapid detection of mycobacteria in primary specimen. Indian J Pathol Microbiol. 2010;53(4):894-5
26. Lehman LG, Ngapmen Yamadji AL, Ngo Sack F, et al. The CyScope® fluorescence microscope, a reliable tool for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(4):906-908
27. Hänscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of Mycobacterium tuberculosis and Coccidiae. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(6):520-521
28. Anthony RM, Kolk AHJ, Kuijper S, Klatser PR.Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10(9):1060-1062
29. Lehman LG, Ngapmen Yamadji AL, Ngo Sack F, et al. The CyScope® fluorescence microscope, a reliable tool for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings. Am J Trop Med Hyg 2010;83(4):906-8
30. Minion J, Sohn H, Pai M. Light-emitting diode technologies for TB diagnosis: what is on the market? Exp Rev Med Devices 2009;6(4):341-345
31. Hänscheid T, Valadas E. Diagnosis of cryptosporidiosis using PCR or auramine O with LED fluorescent microscopy: Which end of the stick? Acta Trop 2009;109(3):247-248
32. Hung NV, Sy DN, Anthony RM, et al. Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. Lancet Infect

Dis. 2007;7(4):238-239
33. Hänscheid T, Ribeiro CM, Shapiro HM, et al.Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. Lancet Infect Dis. 2007;7(4):236-237
34. W. Göhde. Lab diagnosis of HIV/AIDS, tuberculosis and malaria in resource-poor areas http://www.cli-online.com, Issue 8, December 2006