



2001 12



2

2

가

6

.....	iii
.....	iv
.....	v
1	1
2	3
2.1	3
2.2	4
2.2.1	4
2.2.2.	5
2.2.3. 가	5
2.3	6
2.3.1	6
2.3.2	6
2.3.3 가	6
2.3.3.1	7
2.3.3.2	7
2.3.3.3	7
3	8
3.1	8
3.2	9
3.2.1	9
3.2.2	12
3.2.3	15
3.3	16
3.3.1	16

3.3.2 2	.....	17
3.3.3	.....	19
3.4	.....	21
3.4.1	.....	21
3.4.2	.....	23
3.4.3	.....	25
3.5 ,	.....	26
3.6	.....	27
3.6.1	.....	27
3.6.2	.....	29
3.7	.....	30
4	.....	32
4.1	.....	33
4.2 1	.....	34
4.3	.....	35
4.4 ( )	.....	36
5	.....	37
5.1	.....	37
5.2	.....	38
6	.....	39
7	.....	42
	.....	45
Abstract	.....	47

2.1	.....	5
3.1	.....	8
3.2	.....	9
3.3	.....	10
3.4	.....	11
3.5	, , .....	11
3.6	.....	13
3.7	.....	14
3.8	.....	15
3.9	.....	17
3.10	VCO .....	18
3.11	.....	18
3.12	.....	20
3.13	.....	21
3.14	.....	23
3.15	.....	24
3.16	.....	24
3.17	.....	26
3.18	20 × 4 LCD .....	26
3.19	.....	28
3.20	.....	30
3.21	.....	31
3.22	.....	31
4.1	.....	32
5.1	.....	37
7.1	(1000 ) .....	44

3.1	.....	22
3.2	.....	23
5.1	.....	38
6.1	.....	40
6.2	.....	41

가

가 , acid-fast  
 . Acid-fast hot  
 staining cold staining 가 가 , hot  
 staining Ziehl-Neelsen .  
 가 가 ,  
 Ziehl-Neelsen .

가

5.5% 82.8% +'  
 1.1% 95%  
 가 가 .

---

: , Ziehl-Neelsen ,

# 1

1/3 20  
( : 5%, : 95%), 800  
가 . 360 가  
, 360 80  
[1].  
1940  
300 가  
1 .  
가 1993 4  
X- ,  
가  
[2-5].  
가 [3, 6, 7].  
5-10M $\mu$  ,  
[2-9].  
가 Gram ,  
acid-fast . Acid-fast  
hot staining cold staining 가 가 , hot staining  
Ziehl-Neelsen 20 [6,  
9, 10]. cold staining ,  
hot staining

. 2 , 3 , 4 , 5 6 , 7 가 .

## 2

### 2.1

carbolfuchsin  
3% HCl alcohol

가 , 1  
가 . 1  
, 2 methylene blue  
20  
,  
가 ,  
가 [8, 11-13].  
가 1 2  
가 ,  
8 ,  
[2, 3, 14].  
,  
가 [3].

## 2.2

USA)가 4가 Aerospray (Wescor, Inc., Utah, 가 .  
hot staining Ziehl-Neelsen . Hot staining .

### 2.2.1

(Gram Stain)

, Aerospray

가

가

(Tray)

70

15

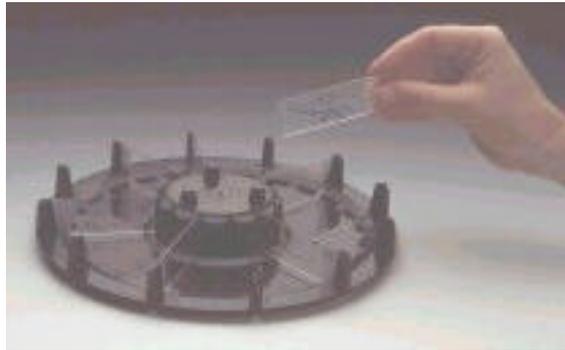
가

가

### 2.2.2

2.1

가 .



2.1

가 .

가 .

### 2.2.3 가

가

2.2.1

가

가

가

15

70

가 carbol-fuchsin 가

## 2.3

### 2.3.1

가

가 hot staining  
Ziehl-Neelsen 가

### 2.3.2

가

가

3 3.2.2 3.2.3

### 2.3.3 가

가

hot staining

가

가

가 가

2.3.3.1

가  
가  
가 , , 가 ,  
가  
가

2.3.3.2

가  
가 , 가  
가  
가  
가  
가

2.3.3.3

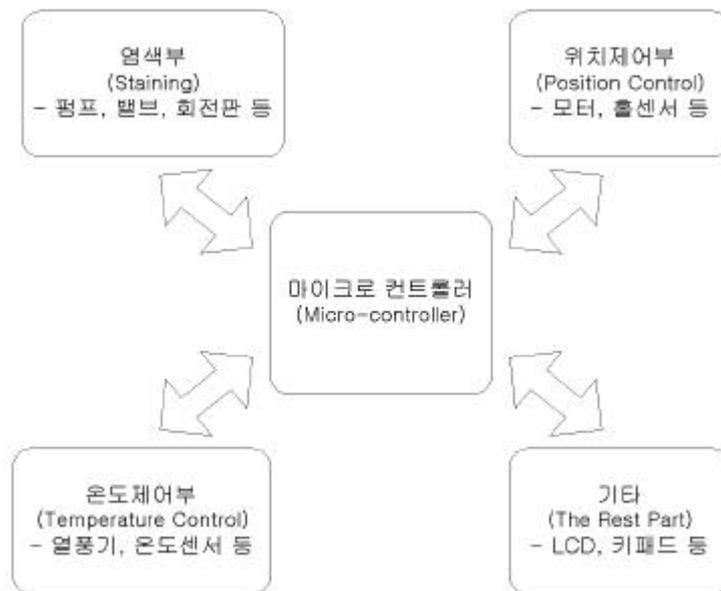
가  
가 , 가  
가  
가  
가

### 3

#### 3.1

LCD

3.1

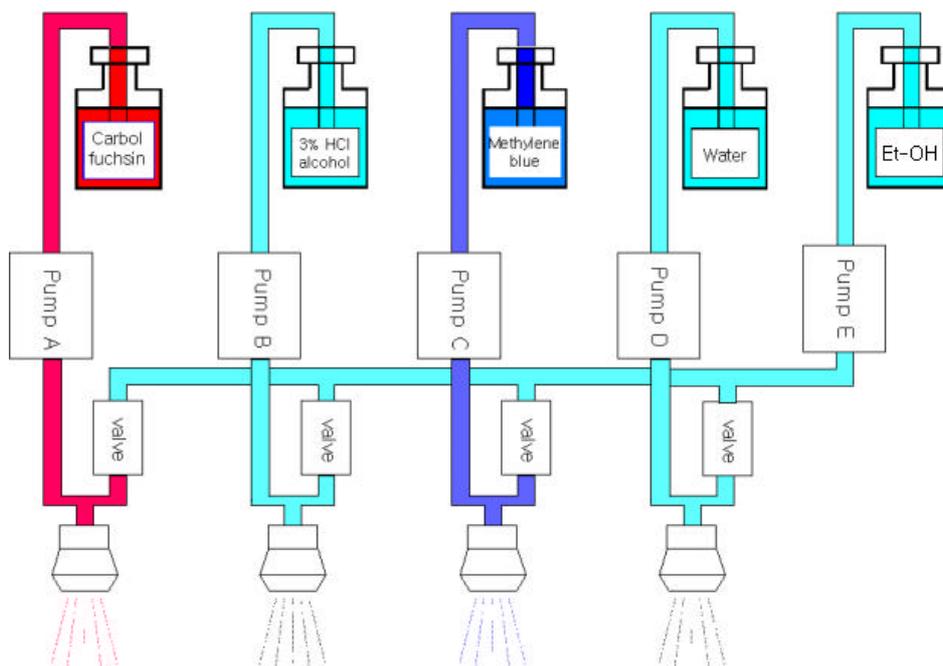


3.1

## 3.2

### 3.2.1

carbolfuchsin sol., 3% HCl alcohol,  
methylene blue,  
99% Ethanol( Et-OH) . 3.2  
99% Et-OH ,  
99% Et-OH Et-OH  
4 가 ,  
Et-OH  
4 가 .



3.2

3.2

5 가 ,

가 65mm × 20mm × 30mm AC 220V 20W

(ET 200, Flojet Co., USA)( 3.3)

8 4

가 .

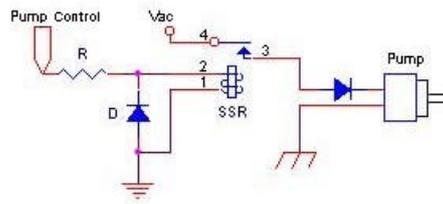
36mm × 30mm × 60mm

6.0 bar DC 24V

(121S432KS1SC2SS1, Honeywell Co., Korea)( 3.4)



(a)



(b)

3.3

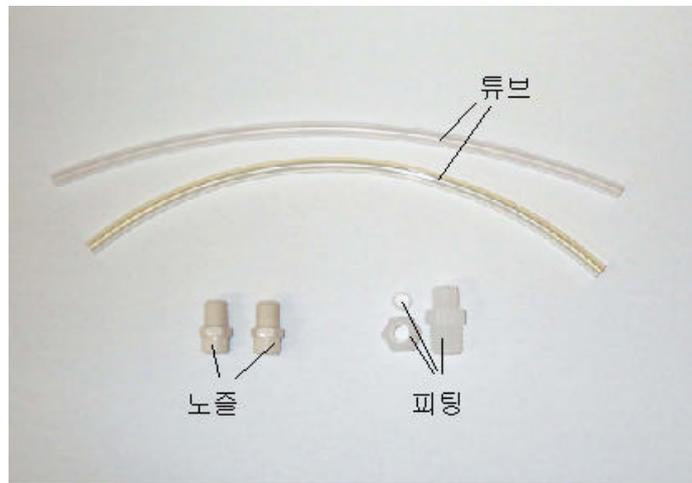
(a)

(b)



3.4

( 3.5 ) , , 4mm ( 3.5 ) carbol-fuchsin sol. 3% HCl alcohol 가 ( 3.5 ) , polypropylene



3.5

3.2.2

3.6

77mm × 22mm

가 1mm

3mm

가

5mm

2mm

가

3.6

(A)

4 가

3.7

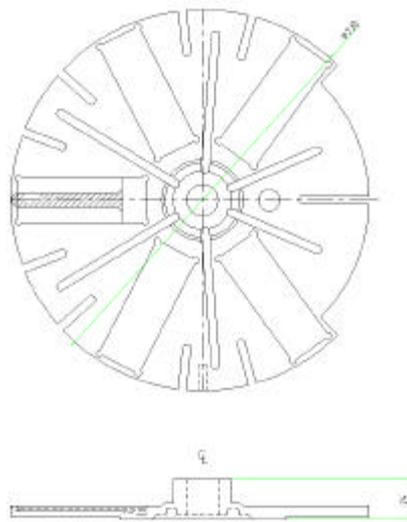
carbolic fuchsin

가

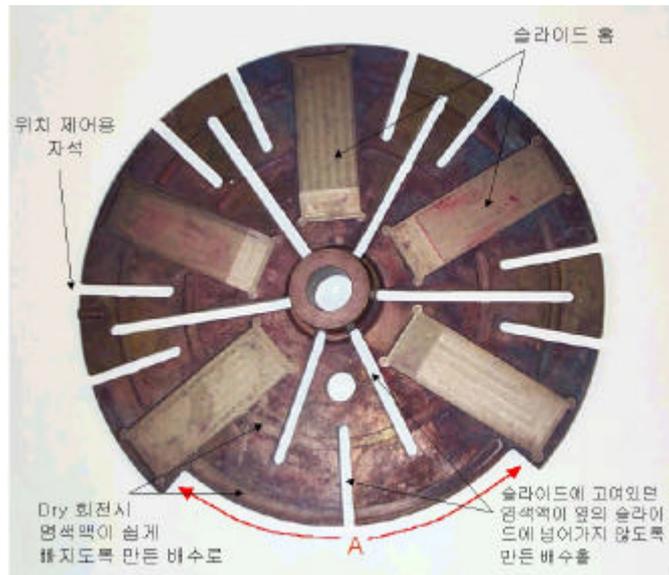
가

가

6mm



(a)

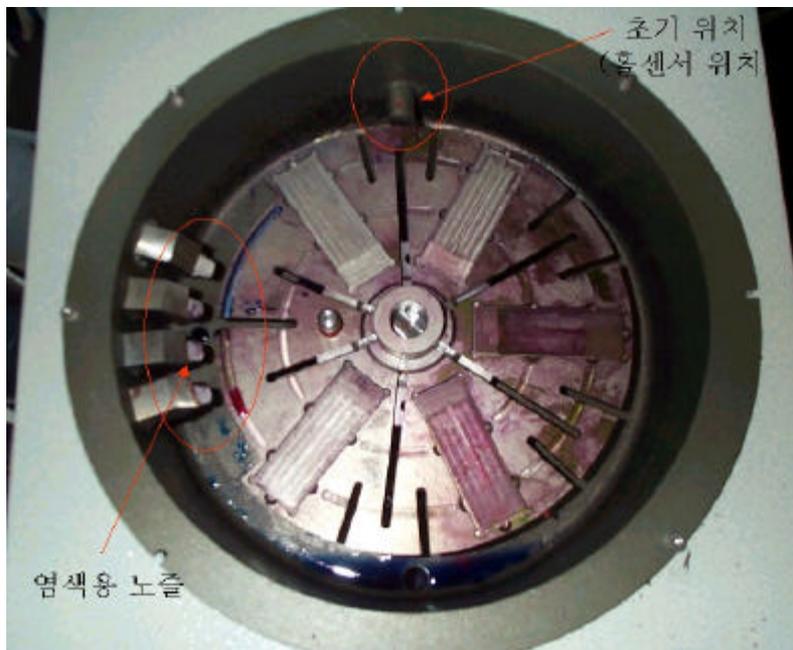


(b)

3.6

(a)

(b)



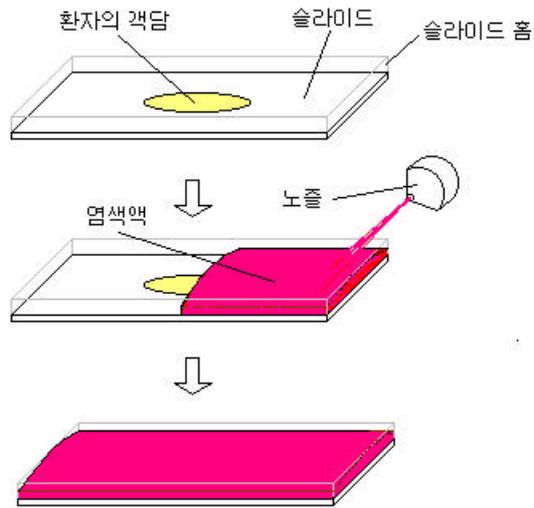
3.7

3.2.3

2.2.2

가

3.8



3.8

### 3.3

4가

15Gauss(1.5mT) (2SS52M-S,  
Honeywell Co., USA)  
1  
( , step angle) 2 (CSK268-AP, Oriental  
Motor Co., Japan)

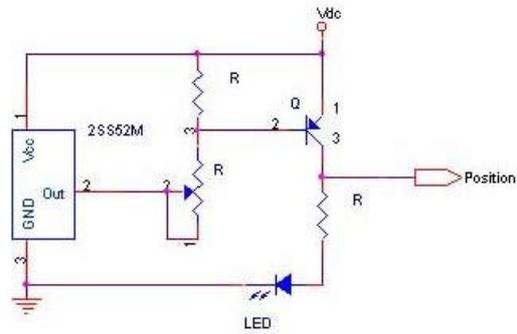
#### 3.3.1

가 가  
가

3.9

LED

LED가



3.9

3.3.2 2

2

, 1

[15].

0.72 0.9

0.5 2

가 가

msec

1 720 (1 )

가 200 rpm

1000 Hz

VCO(Voltage- Controlled Oscillator)

3.10

3.11

. MUX(Multiplexer)



3.3.3

3.12 (a)

가 가

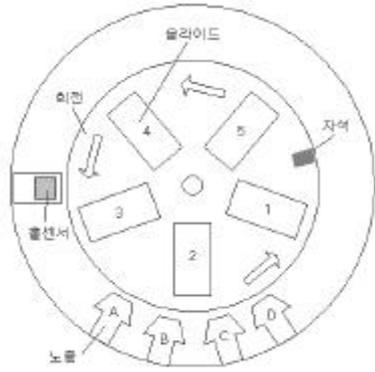
(b)).

1

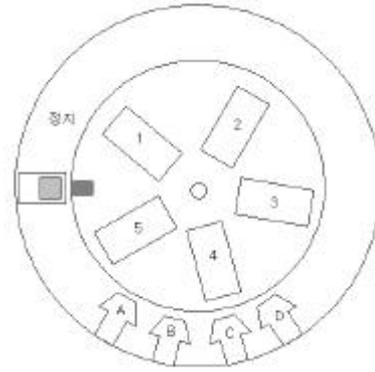
(c)).

가

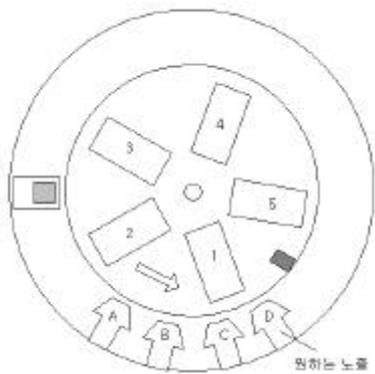
(d)).



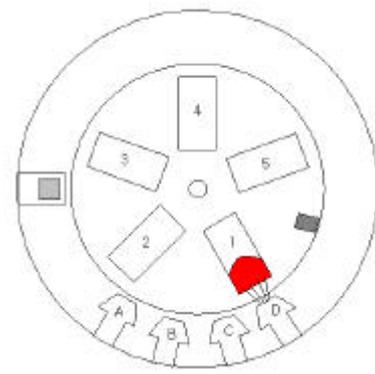
(a)



(b)



(c)



(d)

3.12

(a)

(b)

가

(c)

(d)

### 3.4

Carbol-Fuchsin

75-85

1400W

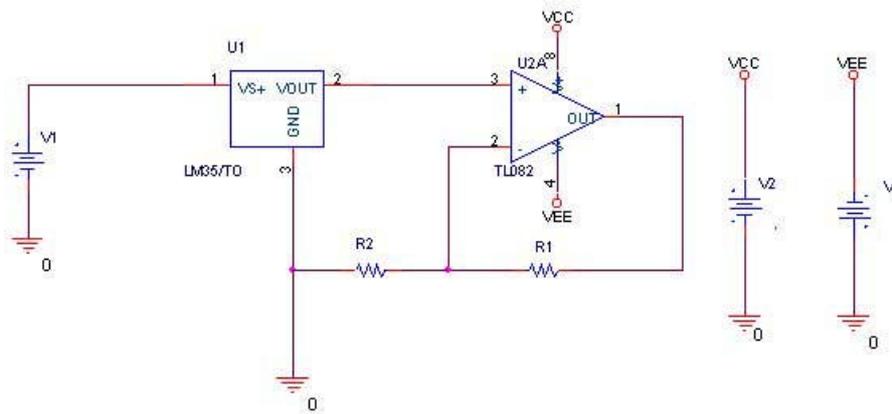
(KX1400, Black&Decker, England)

, 100

(LM35, National Semiconductor Co., USA)

#### 3.4.1

3.13



3.13

LM35 0 - 100 , 1 0.01V

0 - 1V

A/D

, 0 - 5V

0 - 255

0 - 5V

, Op-Amp

5

0V

0

5V

100

A/D

0 0

255가

100 . 2.55 1 . A/D  
 가  
 가 가 2  
 . 5.1 5 2 .

$$= \frac{A/D}{5} \times 2 ( )$$

AZ8803(Deakwang Co., Korea)

가

3.1

가

3.1

( )	AZ8803 ( )
30	30
40	40
50	50
60	60
68	70
74	74
80	80
84	84
88	87

가

AZ8803

4.1

3.2

2-4

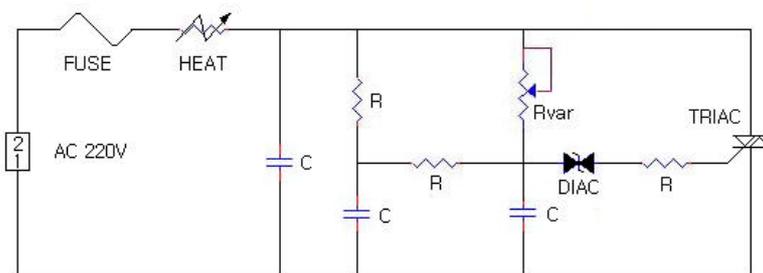
가 ,  
가  
가

3.2

( )		( )	
38	40	66	211
40	42	74	200
42	44	85	284
44	46	79	196
46	54	94	273
54	56	103	299
56	60	112	224
60	64	116	319
64	68	123	203

3.4.2

3.14 AC 220V 가



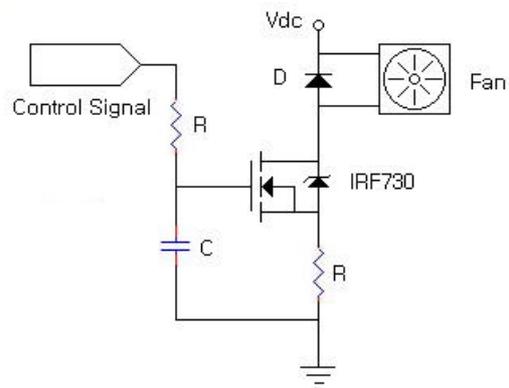
3.14

3.15

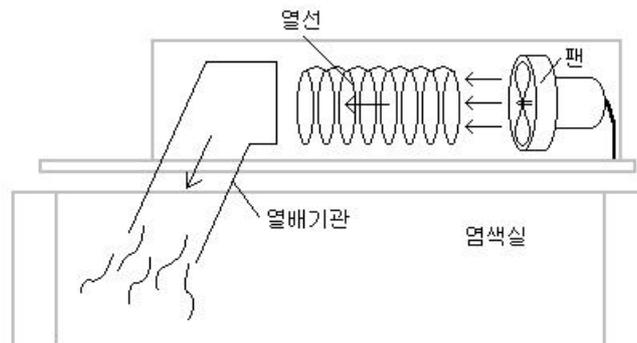
DC

3.16

가



3.15



3.16



### 3.5 입력, 표시부

개발한 자동염색기는 외부에서 원하는 가열온도, 염색시간, 염색할 슬라이드 개수 등의 기본적인 설정 및 염색기의 상태 점검, 그리고 염색기의 각 부분별 청소를 조절할 수 있도록 하였다. 이를 위해 버튼이 10개인 키패드를 제작하였고, 시각적인 정보를 제공해주기 20×4의 LCD(ELCD-204-BL, Comfile Technology, Korea)를 장착하였으며, 염색이 끝났을 때 소리신호로 알려주기 위해 Beep를 장착하였다. 그림 3.17과 그림 3.18은 각각 제작한 키패드와 사용한 20×4의 LCD 패널이다.

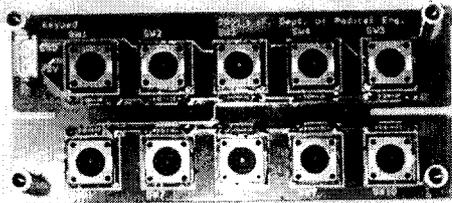


그림 3.17 제작한 키패드

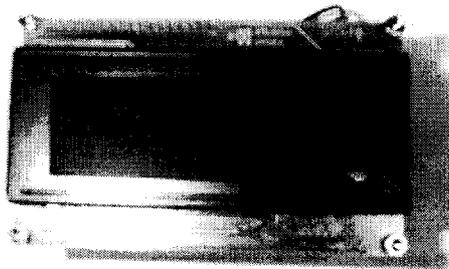
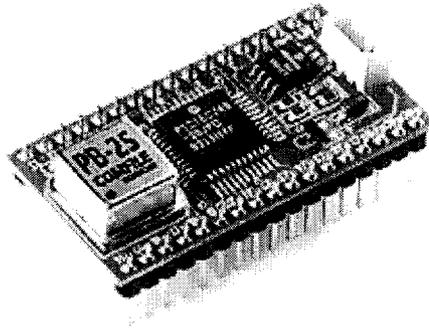


그림 3.18 20×4 LCD

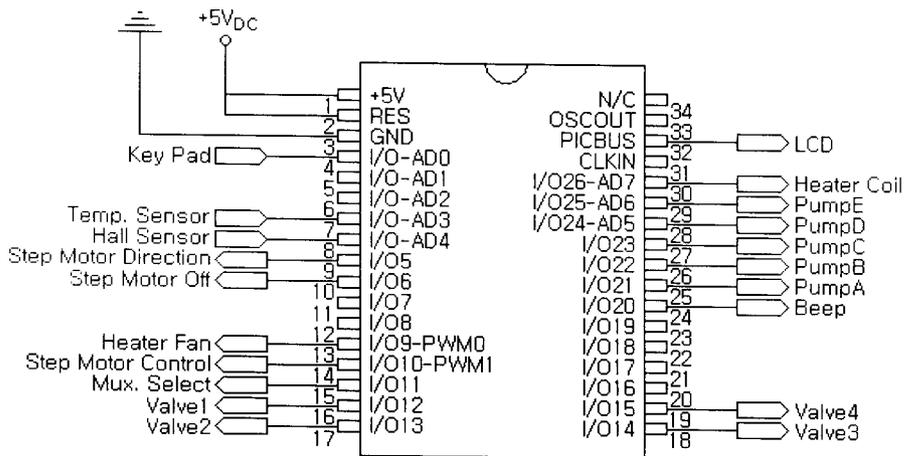
### 3.6

#### 3.6.1

5 , 4 , 1 , 1 ,  
1 , LCD 1 , Beep 1 14 가 , 가  
1 . 4 가 ,  
2 20 .  
2 PWM(Pulse Width Modulation) ,  
1 A/D . PWM  
LCD  
27 가 2 PWM 가 가  
8 A/D (PB-2S, Comfile  
Technology, Korea) .



(a)



(b)

그림 3.19 마이크로 컨트롤러 (a) 실물 사진 (b) 구성도

3.6.2

PICBASIC-LAB V3.9

Comfile Technology

[16].

4가

(Stain mode)

(Prime mode)

가

가

가

가

가

(Clean mode)

가

가

가

99% ET-OH

(Setup mode)

1

1,800

6,914

### 3.7 결핵균 자동염색기의 제작

결핵균 자동염색기의 각 부분의 제어회로는 그림 3.20에서와 같이 하나의 보드로 제작하였다.



그림 3.20 결핵균 자동염색기 제어보드

결핵균 자동염색기에서 열풍기를 작동시키면 염색실 내의 온도는 올라가게 되고 염색기 내부의 온도도 열대류 현상에 의해 자연스럽게 올라가 염색기를 구성하고 있는 하드웨어 등에 영향을 미치게 된다. 그리하여 염색기 뒷편에 냉각팬을 설치하여 염색기 내부의 열기를 염색기 밖으로 배출되도록 하여 염색기 자체가 가열되는 것을 방지하였다.

염색기에서 염색에 사용된 후의 염색액은 회전판을 고속회전 시켜 회전판에서 제거시켰다. 회전판 밖으로 제거된 염색액이 염색실 벽면을 따라서 배수관으로 흐를 수 있도록 염색실 벽면을 배수관쪽으로 경사지게 하여 염색액이 벽면을 따라 배수관으로 흐르게 하였고, 배수관을 통해 나온 염색액은 배수로를 따라서 배수탱크로 저장되게 하였다.

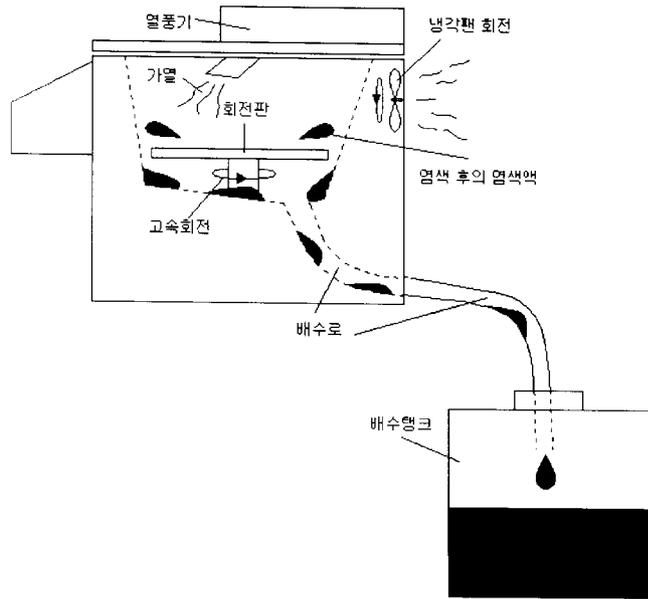


그림 3.21 염색액 및 열 배출도

그림 3.22는 완성한 결핵균 자동염색기 모습이다. 사용전원은 220V이고 소비전력은 700W이다. 우측에 보이는 것이 염색에 사용하는 염색액 및 증류수이다.



그림 3.22 제작한 결핵균 자동염색기

## 제 4 장 염색과정의 결정

염색과정은 Ziehl-Neelsen 방법에 따라 결정하였으며, 소요되는 시간은 총 21분 정도이고 그림 4.1에서와 같이 4단계로 나누어진다. 각 단계에서 염색과정 및 증류수 세척과정이 끝나면 회전판을 20초 정도 회전을 시켜 슬라이드 위에 고여 있던 염색용액이나 물을 제거시킨다.

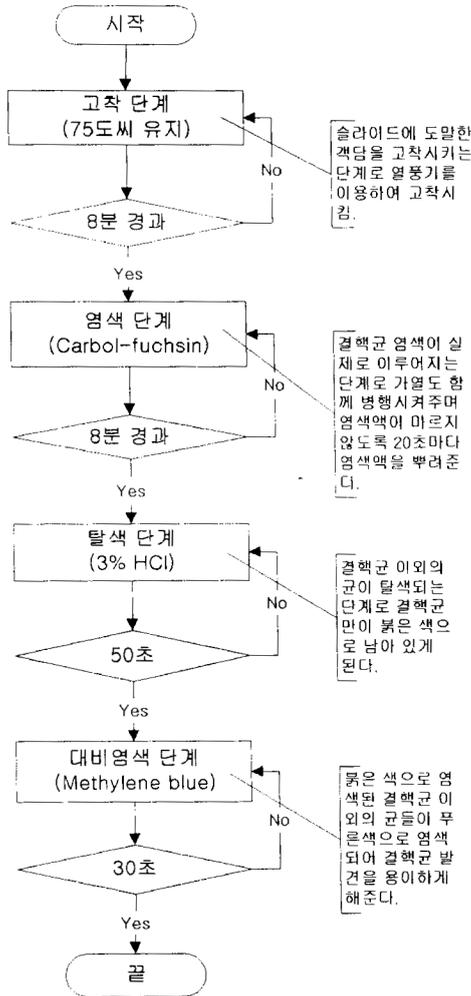


그림 4.1 염색 흐름도

## 4.1

75  
,  
가  
220V  
가  
,  
가  
8  
70-75  
가  
가  
가  
가  
5  
가

## 4.2 1

carbolfuchsin  
[6, 9]. 85  
80-85  
가 가  
3-4Ml 가  
20  
가 5  
가 20  
8  
25-30 Ml . 1

### 4.3

3% HCl , 3-4  
[6, 9]. 50 가  
M $\emptyset$  .  
1

4.4 2 ( )

methylene blue

[6, 9].

3-4 MØ

2

30

## 제 5 장 실험방법

### 5.1 표본의 준비

본 실험에서 사용한 표본은 국립마산결핵병원에서 결핵 치료중인 환자 및 결핵으로 의심되는 환자에게서 당일 채집한 객담(이하 Direct) 37개와 이미 채취한 객담을 원심집균처리하여 배양한 객담(이하 Indirect) 54개가 사용되었다. 각 객담마다 두 개의 슬라이드에 가로 1.5 cm, 세로 1.0 cm의 크기로 도말처리하고 슬라이드에는 환자의 성명 및 날짜를 표시하였다. 원심집균처리한 객담을 도말처리한 슬라이드의 경우에는 12시간 이상 자연건조를 시켰다.



그림 5.1 완성된 객담표본

## 5.2

가

AFB 가 (CH30-213E, Olympus Co., Japan) 1000

5.1 IUATLD(International Union Against TB & Lung Disease) 5

[17]. 100 (field) -

, 1-9 가 . 10-99 가 +

. 50 1-10 ++

, 20 10 +++

### 5.1

No. of AFB observed / field	Recording
0 / 100	-
1 - 9 / 100	(exact figure / 100)
10 - 99 / 100	+
1 - 10 / (50 field )	++
10 / (20 field )	+++

# 6

가 ( )  
 ) ( )  
 가 . 91 62  
 .  
 6.1 29 .  
 가 13 , 가  
 가 8 , 8 .  
 , 82.8% , Direct 85.73% ,  
 Indirect 81.8% . Ziehl- Neelsen  
 Mycobacteria (exact  
 figure/ 100 fields) +  
 20 19 가 +  
 95% , 가 4  
 6 가 .  
 9 4 (-)  
 , 3 2 (+)  
 .  
 ,  
 가 .  
 2

## 6.1

Direct	1	+	+
	2	4	-
	3	++	++
	4	+	++
	5	++	++
	6	3	+
	7	+++	+
Indirect	8	5	1
	9	7	3
	10	+	+
	11	7	5
	12	+	+++
	13	++	+
	14	++	+
	15	+	++
	16	+	+
	17	+	++
	18	5	+
	19	+	++
	20	+	-
	21	1	-
	22	+	+
	23	7	-
	24	+	+++
	25	4	-
	26	+	+
	27	++	++
	28	++	++
	29	++	++

6.2 . 26.4%

31.9% 5.5% +

23.1% 1.1% .

82.8%

, + 95%

가

가

6.2

		(%)	(%)
Direct		18.9	16.2
	+	13.5	16.2
Indirect		40.7	33.3
	+	22.8	22.8
T otal		31.9	26.4
	+	22.0	23.1



1000

,

7.1

,

1

가

가

가

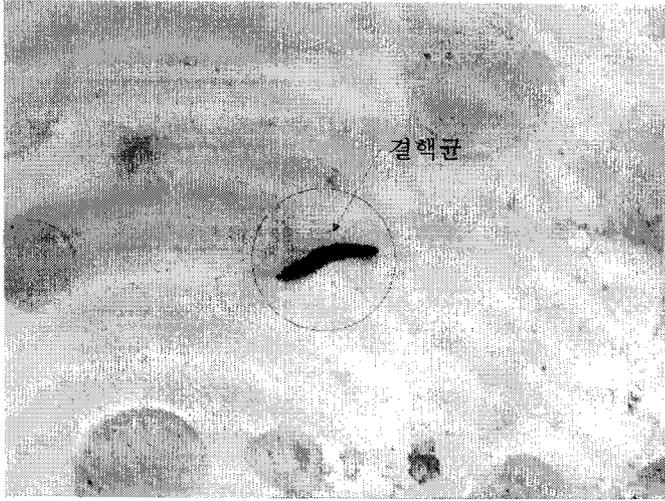
,

가

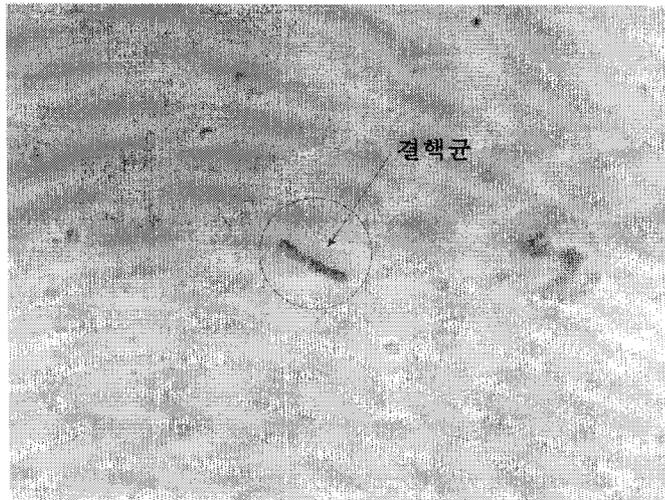
가

가

30



(a)



(b)

그림 7.1 염색결과(1000배 확대) (a) 자동염색 결과 (b) 수동염색결과

1. , , , 46 , 3 , pp. 301-310, 1999
2. , , , 46 , 4 , pp. 466-475, 1999
3. , , , 45 , 4 , pp. 675-686, 1999
4. , , , 44 , 6 , pp. 1447-1453, 1997
5. D.C. Edward, R. Randall, T.B. John, J.B. Patrick, and E.H. William, "Diagnosis of Tuberculosis by a Visually Detectable Immunoassay for Lipoarabinomannan", Am. J. Respir. Crit. Care Med., Vol.161, No.5, pp. 1713-1719, 2000
6. P.J. Bishop and G. Neuman, "The History of the Ziehl Neelsen Stain", Tubercle, Vol.51, pp.196-206, 1970
7. M.D. Rossman and R.L. Mayock, "Pulmonary Tuberculosis", Tuberculosis 2nd Edition, pp. 99-116, 1987
8. C.L. Cardoso, L.R.B. Giacomelli, C. Helbel, J.J. SantAna, F.M. Martins, and A.M.W. Barreto, "Survival of Tubercle Bacilli in Heat-fixed and Stained Sputum Smears", Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 96, No. 2, pp. 277-280, 2001
9. G.D. Roberts, Bacteriology and Bacteriologic Diagnosis of Tuberculosis , Tuberculosis 2nd Edition, pp. 37-52, 1987
10. , , , , 36 , 4 , pp. 354-361, 1989
11. N. Tatsumi, I. Tsuda, T. Takubo, M. Hino, T. Imai, and V. Hove, "Method to Evaluate an Automated Slide Maker and Stainer System Tested on the CELL-DYN SMS", Carden Jennings Publishing Co., Laboratory Hematology

- 4, pp. 58-63, 1998
12. M.A. Soltys, "Anthrax in a laboratory worker, with observations on the possible source of infection", *Journal of Pathology and Bacteriology*, Vol.60, pp. 253-257, 1948
13. B.W. Allen, "Survival of Tubercle Bacilli in Heat Fixed Sputum Smears", *Journal of Clinical Pathology*, Vol.34, pp. 719-722, 1981
14. J. Aslanzadeh, M.D. Viuda, M. Fille, W.B. Smith, and H. Namdari, "Comparison of culture and acid-fast bacilli stain to PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples", *Molecular and Cellular Probes*, Vol.12, pp. 207-211, 1998
15. T. Kenjo and A. Sugawara, "Stepping Motors And Their Microprocessor Controls", 2nd Edition, Clarendon Press, 1994
16. PICBASIC databook, Comfile Technology, 1998
17. H.L. Rieder, T.M. Chonde, H. Myking, R. Urbanczik, A. Laszlo, S.J. Kim, A.V. Deun, and A. Trébucq, "The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network - Minimum Requirements, Role and Operation in a Low-Income Country", *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 1998

## **Abstract**

### **Development of the *Mycobacterium tuberculosis* Auto Stainer**

Kang, Seung Il  
Interdisciplinary Program of  
Biomedical Engineering  
The Graduate School  
Yonsei University

Detection of tubercle bacilli(TB) from sputum smear by staining and microscopy is rapid and inexpensive for diagnosis of tuberculosis. In this method, sputum smears are fixed by heating, stained by acid-fast staining method, and then examined using a microscope. Two procedures are commonly used for TB staining. One is hot staining and the other is cold staining methods. The Ziehl-Neelsen hot staining method is widely used in Korea. For an auto cold stainer without heater, sputum smear have to be fixed manually, and staining is often not uniform depending on the technical skill. In this study, auto stainer with heating function was built to fix sputum smear on a slide automatically and to stain it with heating. It reduces labour time and person to person variation of staining. It also makes TB's stain clearer. So, when we detect TB in sputum, accuracy of detection is high. When smear microscopy results were compared between manual and auto staining methods, the discordant rate was 17.2%, but it was only 5% for smear '+' sputum sample. So, difference between stain by manual and that by auto stainer is small, and the auto stainer looks promising for use in the clinical microbiology laboratory for TB staining.

---

Key words : tubercle bacilli(TB), Ziehl-Neelsen method, Mycobacterium tuberculosis auto stainer