

## 결핵균 자동염색기의 개발 및 평가

김수찬<sup>1,2</sup> · 강승일<sup>1,2</sup> · 김승철<sup>3</sup> · 황정호<sup>4</sup> · 김성녕<sup>4</sup> · 김 영<sup>5</sup> · 송선대<sup>5</sup> · 조상래<sup>3</sup> · 김덕원<sup>2</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 대학원 생체공학협동과정, <sup>2</sup>연세대학교 의과대학 의학공학교실,  
<sup>3</sup>연세대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>4</sup>한국생산기술연구원, <sup>5</sup>국립마산결핵병원  
(2002년 2월 15일 접수, 2002년 6월 10일 채택)

## Development and Evaluation of an Automated Stainer for Mycobacterium Tuberculosis

S.C. Kim<sup>1,2</sup>, S.I. Kang<sup>1,2</sup>, S.C. Kim<sup>3</sup>, J.H. Hwang<sup>4</sup>, S.Y. Kim<sup>4</sup>, Y. Kim<sup>5</sup>, S.D. Song<sup>5</sup>, S.N. Cho<sup>3</sup>, D.W. Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Biomedical Engineering, Yonsei University, <sup>2</sup>Department of Medical Engineering, College of Medicine, Yonsei University, <sup>3</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul,  
<sup>4</sup>Korea Institute of Industrial Technology, Chunan, <sup>5</sup>National Masan Tuberculosis Hospital, Masan  
(Received February 15, 2002. Accepted June 10, 2002)

**요약** : 결핵을 진단하는 방법 중에서 신속하고 비교적 비용이 적게드는 방법은 객담을 통한 결핵균 도말 검사이다. 결핵균 도말 검사는 슬라이드에 도말한 환자의 객담을 가온 과정을 통해 고착시키고, acid-fast 염색방법을 통해 염색시킨 후 현미경으로 결핵균을 관찰하는 것이다. Acid-fast 염색방법은 크게 hot staining과 cold staining 방법 두 가지가 있으며, 우리나라에서는 염색 결과가 선명한 hot staining 방법인 Ziehl-Neelsen 방법을 주로 이용한다. 그러나, 기존의 결핵균 자동염색기는 가온 기능이 없어 환자의 객담을 슬라이드에 검사자가 고착을 시켜야 하고, 선명도도 낮은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 검사자의 인력 절감과 검사자 개인의 염색 능력에 따른 염색 정도의 변화를 줄이기 위해 가온이 가능한 결핵균 자동염색기를 개발하였다. 개발된 염색기는 객담의 고착에서 염색, 그리고 건조까지 전 과정이 자동으로 이루어진다. 염색 시간은 5개의 슬라이드를 고품질로 염색할 경우 21분이 소요되었다. 성능 평가를 위해 총 91개 객담을 대상으로 자동과 수동염색을 시행하여 일치율을 비교해 본 결과 95%로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $p>0.05$ ).

**Abstract** : The detection of tubercle bacilli(TB) from sputum smear is one of the fast and inexpensive methods for diagnosis of tuberculosis. For this method, sputum smears are usually fixed by heating and stained by acid-fast staining method, and then examined under an optical microscope. Two procedures are commonly used for TB staining. One is hot staining and the other is cold staining method. The Ziehl-Neelsen method which is a hot staining method is widely used in Korea because its stained color is more vivid. However, the conventional automated stainer has to fix the sputum smear on a slide manually and the stain is not so vivid because it has not heating function. In an effort to save labor and minimize variations in manual staining procedure, we developed an automated stainer with heating function. The entire staining process is fully automated, from fixation to final washing and drying. With the automated methods, five slides can be fixed and stained in 21 minutes at consistent high quality. We compared the concordance rate between the two methods for 91 sputum samples to validate the stain quality of the developed automated stainer. As the results, the concordant rate between the two methods was 95% and there was no significant difference ( $p>0.05$ ).

**Key words** : Tubercle bacilli(TB), Acid-fast staining, Ziehl-Neelsen method, Automated stainer, Heating function

본 연구는 한국 1999년 생산기술연구원 의료기기 시범사업 (PEM 99090)과 과학기술부의 국가 지정 연구실 사업(00-2-551)의 지원으로 수행되었음.

통신저자 : 김덕원, (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 의학공학교실

Tel. (02)361-5402, Fax. (02)364-1572

E-mail. kdw@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

결핵 감염 여부를 판별하는 방법에는 환자의 증상, 흉부 X-선, 객담의 균 도말 및 배양검사 등이 있으나, 이중에서도 임상에서 많이 이용되는 방법은 객담을 통한 결핵균 도말 검사이다[1-4]. 객담을 이용한 결핵균 도말 검사를 하기 위해서는

환자에게서 약 5 ml의 객담을 채집하여 염색과정을 거친 후, 현미경으로 관찰하게 된다[5]. 그러나 결핵균은 고지질의 세포벽을 가지고 있어서 기존의 그람(Gram) 염색 방법으로는 염색이 되지 않아, acid-fast 염색 방법에 의해서 염색을 하여야 한다[6]. Acid-fast 염색방법은 크게 hot staining 방법과 cold staining 방법 두 가지가 있으며, 우리나라에서는 hot staining 방법인 Ziehl-Neelsen 방법을 주로 사용하며 총 20분 정도의 시간이 소요된다[5-7]. Cold staining 방법보다 슬라이드에 고착이 더 잘되며, 결핵균의 관찰 시 균의 형태 및 색상이 더 선명하다[8,9].

일반 세균 검사에서는 세균의 증식 속도가 빨라 배양한지 1일 내지 2일 정도가 지나면 결과를 알 수 있어 도말 검사의 중요성이 낮아 질 수 있으나, 결핵균의 경우는 일반 세균과는 달리 배양기간이 8주 이상 소요되어 짧은 시간에 알 수 있는 객담 도말 검사를 통한 현미경적 관찰이 결핵의 조기발견에 대단히 중요하다[1-4,7]. 그런 이유로 결핵 검사자의 균 염색 숙련도 등이 요구되었으며, 다른 한편으로는 검사자의 숙련도에 상관없이 수동염색의 결과와 동일한 염색결과를 낼 수 있는 적절한 결핵균 자동염색기가 필요하게 되었다.

슬라이드에 도말한 환자의 객담을 염색하기에 앞서 염색 시 객담이 슬라이드로부터 떨어져 나가는 것을 막기 위해 가온 과정을 통해서 고착시키게 된다[5]. 그러나 그람 염색에 사용되는 자동염색기를 이용할 경우 염색 전에 검사자가 수동으로 가온하여 고착시킨 다음 염색기에 넣어주어야 하며, 국내에 수입된 결핵균 자동염색기인 Aerospray(Wescor, Inc., USA)나 기존의 결핵균 염색기도 가온 기능이 없어 검사자가 환자의 객담을 슬라이드에 직접 알코올 램프로 가온하여 고착시킨 다음 염색기에 넣어주어야 한다. Carbol-fuchsin 염색 과정에서도 염색의 선명도를 위해 가온을 해야하지만 현재 시스템에서는 가온 기능이 없어 결핵균이 선명하게 염색되지 않는 문제점이 있다.

본 연구에서는 기존의 결핵균 자동염색기가 갖고 있는 이러한 문제점들을 개선하여 객담을 도말한 후 고착과 염색을 염색기 내부에서 모두 가능하도록 하여 검사자의 염색 능력에 대한 의존도를 낮추고, 결핵균의 염색 선명도를 높일 수 있는 가온 기능이 있는 결핵균 자동염색기를 개발하였다. 개발된 염색기의 성능은 결핵균 환자의 객담을 사용하여 수동과 자동염색 결과를 비교하여 평가하였다.

**방 법**

**1. 염색기의 제작**

개발된 결핵균 자동염색기는 그림 1과 같이 펌프, 밸브 등으로 이루어진 염색부와 회전판, 모터 등으로 이루어진 위치제어부, 그리고 열풍기, 온도센서 등으로 이루어진 온도제어부로 구성되어 있으며, 이러한 일련의 과정들은 염색기 외부의 LCD에 표시되도록 하였고 전체 시스템 제어는 PIC 마이크로컨트롤러를 이용하여 구현하였다.

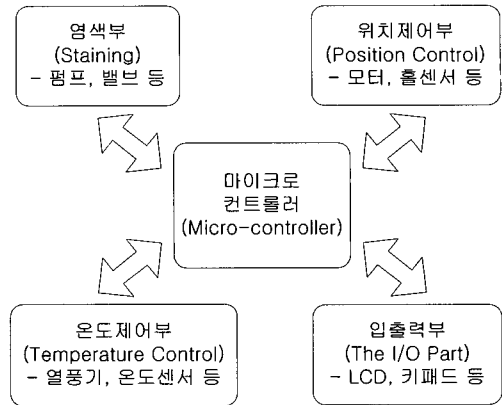


그림 1. 개발된 자동 염색기의 시스템 구성도  
Fig 1. Block diagram of the developed auto stainer

결핵균 염색에 사용되는 용액은 carbol-fuchsin, 3% HCl 알코올, 메틸렌블루, 증류수, 에탄올(ethanol)을 사용하였다. 그림 2는 염색액과 노즐의 연결도로서 각 염색에 사용되는 노즐마다 99% 에탄올과 연결하여 에탄올로 청소를 할 수 있도록 하여 염색 후 노즐의 막힘을 방지하였다. 염색 시에는 염색액 쪽의 펌프를 작동시키고, 청소 시에는 솔레노이드(solenoid) 밸브를 열고 펌프 E를 동작시킨다. 이때 다른 염색액으로의 에탄올의 역류는 펌프 A~D에 의해 방지된다. 본 연구에서 사용한 펌프는 진동 펌프(ET200, Flojet Co., USA)로 총 5개를 사용하였고, 밸브는 솔레노이드 밸브(121S, Honeywell, USA)로 총 4개가 사용되었다. Carbol-fuchsin 용액 및 3% HCl 알코올 용액은 산성으로 부식의 위험이 있으므로 연결 튜브 및 노즐, 피팅(fitting) 등은 내약품성이 있는 폴리프로필렌(polypropylene) 및 테프론(Teflon) 재질을 사용하였다.

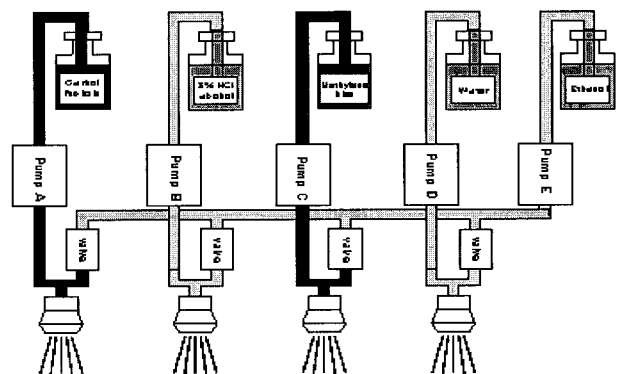


그림 2. 염색부의 연결 구조도  
Fig. 2. Structure of the stain part

기존의 결핵균 자동염색기는 슬라이드를 세로로 세워서 고정시키고 슬라이드에 고착된 환자의 객담에 염색액을 직접 분사하기 때문에 그 압력으로 객담의 상당 부분이 떨어져 나가며 염색액이 슬라이드 위에 고이지 않아 염색액이 결핵균에

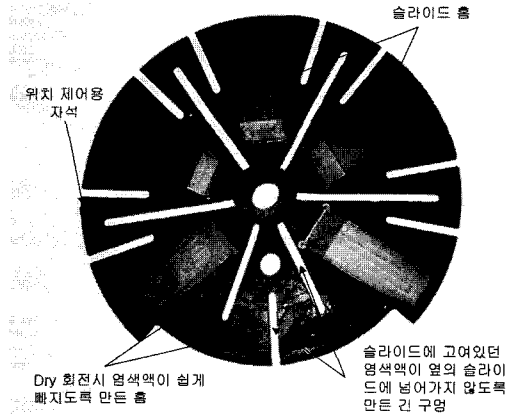
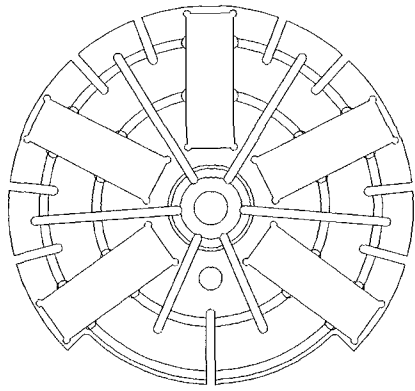


그림 3. 염색기 회전판  
Fig. 3. Tray of stainer

제대로 스며들지 않는다. 이 문제를 해결하기 위해 회전판에 그림 3과 같이 3mm의 깊이로 홈을 내어 슬라이드를 눌러서 삽입하여 염색액이 슬라이드 위를 쉽게 덮을 수 있도록 하였다. 슬라이드 홈 옆에는 건조를 위한 고속 회전 시 용액이 쉽게 빠져나갈 수 있도록 깊이가 1mm인 통로를 만들었고 슬라이드와 슬라이드 사이에도 용액이 섞이지 않도록 통로를 만들었다.

염색액은 그림 4와 같이 슬라이드 끝 부분에서부터 점차적으로 슬라이드 전체에 고이게 함으로써 분사압력에 의한 객담의 이탈을 방지하였다. 회전판의 회전은 2상 스텝모터(CSK268-AP, Oriental Motor Co., Japan)를 사용하였고, 매 회전마다 회전판에 부착된 자석과 염색 용기 내에 부착된 자기 센서(2SS52M, Honeywell, USA)를 이용하여 초기 위치를 설정하도록 하였다.

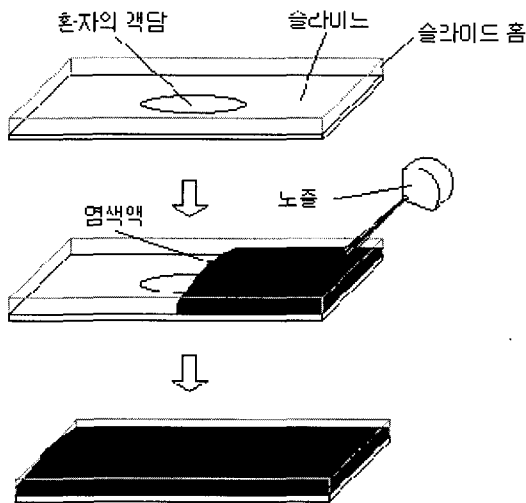


그림 4. 객담을 도말한 슬라이드에 염색액을 분사하는 과정  
Fig. 4. Process of spraying reagent on a smear slide

슬라이드에 도말한 객담의 고착 및 carbol-fuchsin 염색 시 결핵균 자동염색기 내부의 온도를 75-85℃까지 유지시키기 위해 1400W의 출력을 갖는 공업용 열풍기(KX1400, Black & Decker, England)를 사용하였으며, 100℃ 이내의 온도를 감지하는 센서(LM35, National Semiconductor, USA)를 이용하여 온도를 감지하였다. 현재 진행 중인 염색상태는 LCD를 통해서 보여주도록 하였고, 염색 시간을 설정하거나 슬라이드 개수 등을 조절할 수 있도록 버튼이 10개인 키 패드를 사용하였다. 제어는 Comfile Technology사에서 제공하는 PICBASIC (PB-1S, Comfile, 대한민국)을 사용하였다[10].

2. 염색과정

염색과정은 Ziehl-Neelsen 방법에 따라 결정하였으며, 소요되는 시간은 총 21분 정도이고 그림 5와 같이 4단계로 나누어진다. 각 단계에서 염색과정 및 증류수 세척과정이 끝나면 회전판을 20초 정도 회전을 시켜 슬라이드 위에 고여있던 염색 용액이나 물을 제거시켰다.

고착 단계

슬라이드에 도말한 환자의 객담을 고착시키는 과정으로 총 8분이 소요된다. 염색 용기내의 온도는 70℃-75℃로 유지시키며, 회전판을 서서히 회전시켜 염색할 슬라이드 전체가 균등하게 가온 되도록 하였다.

1차 염색 단계

고착 단계를 거친 객담을 carbol-fuchsin 용액으로 염색하는 과정으로 결핵균은 붉은 색으로 염색된다. 염색이 짧은 시간에 보다 잘 이루어지도록 염색 용기내의 온도는 80-85℃를 유지시킨다. 이 단계에서는 슬라이드 온도가 높아 20초 간격으로 염색액을 계속해서 뿌려 슬라이드에 고여 있는 염색액이 건조되는 것을 방지하였다. 표본객담 1개당 소비되는 염색액체량은 10~15 ml이었다.

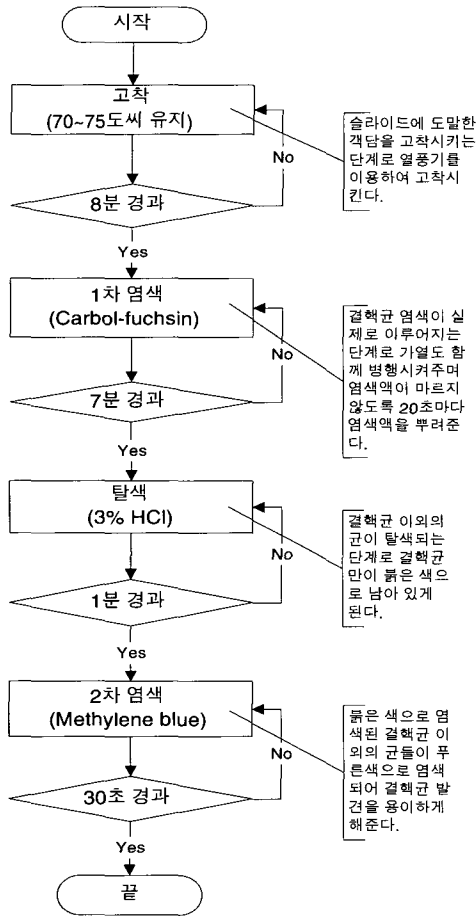


그림 5. 자동 염색 흐름도  
Fig. 5. Flow chart of auto staining

**탈색 단계**

결핵균 이외의 다른 균들의 염색을 제거하기 위해 3% HCl 알코올 용액으로 탈색시켰다. 이 단계를 통해 결핵균만이 붉은 색으로 관찰된다. 슬라이드 당 3-4 ml의 염색액을 한번만 분사 시켜주었으며 탈색이 끝나면 증류수로 남은 탈색액을 세척하였다.

**2차 염색(대비염색) 단계**

결핵균 이외의 균들을 푸른색으로 염색시키는 단계로 메틸렌블루 용액을 사용하여 장내세균 등 오염된 균의 관찰을 용이하게 한다. 슬라이드 당 3-4 ml의 염색액을 한번만 분사하였

으며 대비 염색이 끝나면 증류수로 남은 메틸렌블루를 세척하였다.

**3. 염색기의 성능평가**

**표본의 준비**

국립마산결핵병원에서 결핵 치료중인 환자 및 결핵으로 의심되는 환자에게서 당일 채집한 객담(이하 직접 도말(Direct)) 37개와 이전에 채취한 객담을 원심 분리를 통해 집균하고 배양한 객담(이하 집균 도말(Indirect)) 54개를 대상으로 실험하였다. 각 객담마다 두 개의 슬라이드에 가로 1.5 cm, 세로 1.0 cm의 크기로 도말 처리하고 슬라이드에는 환자의 성명 및 날짜를 표시하였다. 원심 집균 처리한 객담을 도말 처리한 슬라이드의 경우에는 자연건조를 시켰다.

**표본의 염색 및 관찰**

두 개의 표본 중 하나는 10년 이상의 경력이 있는 숙달된 검사자가 기존의 방법인 수동으로 고착 및 acid-fast 염색을 하고 다른 하나는 개발된 자동염색기로 고착 및 염색을 하였다. 염색된 두 표본은 검사자가 현미경(CH30-213E, Olympus Co., Japan)으로 1000배의 배율로 관찰한 후, 그 결과를 표 1의 IUATLD(International Union Against TB & Lung Disease)에서 정한 진단 기준표에 따라 5단계로 나누어서 기록하였다[5,11]. 100 시야(field)를 관찰하여 결핵균이 발견되지 않으면 음성(-)으로 기록하였고, 1~9개가 발견되면 발견된 결핵균 수를 기록하고, 10~99개가 발견되면 양성(+)으로 기록하였다. 50 시야를 관찰하면서 매 시야마다 1-10개의 결핵균이 발견되면 ‘++’로 기록하였고, 20 시야를 관찰하면서 매 시야마다 10 이상의 결핵균이 발견되면 ‘+++’로 기록하였다.

얻어진 결핵균의 결과를 식 (1)과 같이 전체 검체의 수에 대하여 수동 및 자동염색의 결과가 일치되는 검체의 수를 비교한 일치율과 식 (2)와 같이 전체 검체의 수에 대하여 결핵균이 검출된 검체 수를 비교한 균 검출율을 통하여 성능을 평가하였다.

$$\text{일치율(\%)} = \frac{\text{수동 및 자동 염색에서 동일한 결과를 보인 검체의 수}}{\text{전체 검체의 수}} \quad (1)$$

$$\text{균 검출율(\%)} = \frac{\text{결핵균이 검출된 검체의 수}}{\text{전체 검체의 수}} \quad (2)$$

표 1. 결핵 진단 기준표  
Table 1. Table for acid-fast bacilli evaluation

단 계	관찰된 결핵균 수 / 시야	기 록	비 고
1	0	-	음 성
2	1 - 9 / 100시야	실수(exact figure / 100 시야)	양 성
3	10 - 99 / 100시야	+	양 성
4	1 - 10 / 최소한 50 시야에서 매 시야 당	++	양 성
5	10 이상 / 최소한 20 시야에서 매 시야 당	+++	양 성

**실험결과 및 고찰**

**1. 개발된 결핵균 자동염색기**

그림 6은 개발된 결핵균 자동염색기를 보여준다. 크기는 365 (가로) × 385 (세로) × 250 (높이) mm이고, 사용전원은 220V 전용, 소비 전력은 700W이다. 한번에 염색 가능한 슬라이드 수는 총 5개이고 염색시간은 최대 21분 소요된다.

그림 7은 자동염색 및 수동염색의 결핵균 염색상태를 보여준다. 대부분의 자동염색에서는 결핵균이 붉은 색으로 진하게 염색되어 있었지만, 수동염색의 경우 결핵균이 붉은 색 또는 선홍색으로 염색되는 등 일정하게 염색이 되지 않았다. 이처럼 결핵균을 염색할 때 염색이 제대로 이루어지지 않게 되면 하나의 균이라도 검출해야하는 검사자의 입장에서는 균 검출에 대한 어려움 및 피로감을 느끼게 된다.

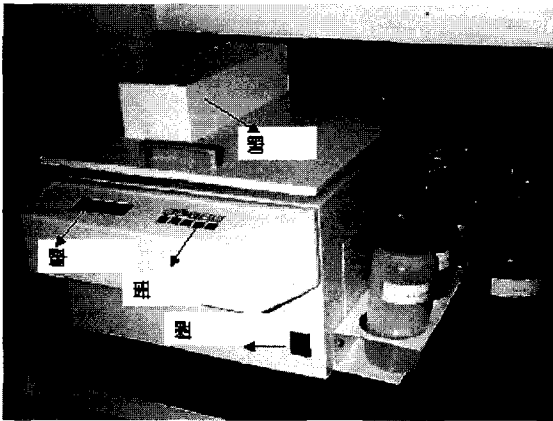


그림 6. 개발한 결핵균 자동 염색기 외관  
Fig. 6. Photograph of the developed Mycobacterium tuberculosis auto stainer

**2. 염색기 성능 분석**

표 2는 직접 도말(Direct)과 집균 도말(Indirect)된 검체 91개의 객담에 대하여 자동과 수동염색을 시행한 결과를 결핵

진단표를 기준으로 정리한 것이다. 62개 검체의 경우는 수동염색 및 자동염색의 결과가 모두 동일한 음성으로 나왔고 나머지 29개의 경우는 슬라이드 상에서 결핵균이 관찰되었다. 결핵균이 관찰된 것들 중 수동염색과 자동염색 결과가 동일하게 나타난 경우는 13개였으며, 수동염색 결과가 자동염색 결과보다 높은 단계로 나온 경우가 8개, 낮은 단계로 나온 경우는 8개였다.

수동염색과 자동염색의 일치율은 95%(86/91)이었으며, 이중 직접 도말 검사인 경우는 97%(=36/37)이었고, 집균 도말 검사인 경우에는 93%(=50/54)이었다. 그러나 Ziehl-Neelsen 방법으로 염색을 하였을 때 실수(exact figure/100 fields)로 기록된 표본객담은 결핵균인지 혹은 결핵균 이외의 mycobacteria인지 구분할 방법이 없다. 따라서 결핵균 염색의 정도만을 명확하게 판단하기 위해 수동염색에서 실수(exact figure)로 판별된 샘플들을 제외한 '+' 이상으로 판명된 객담에 대해서 자동염색 결과와 비교했을 경우 일치율은 97%(=88/91)로 상당히 높았다.

수동염색이 실수로 기록된 9개의 표본객담의 경우 자동염색에서 4개는 음성(-)으로 나왔지만, 3개는 실수로 기록되었으며 나머지 2개는 오히려 양성(+)으로 판정되었다. 이것은 자동 염색기에서 고착이 제대로 이루어져서 염색하는 도중 결핵균이 쏠려 내려가지 않았음을 보여줄 뿐만 아니라, 자동 염색이 수동염색에 조금도 뒤지지 않음을 보여주는 결과이다.

표 3은 수동염색과 자동염색의 균 검출율이다. 자동염색이 26%의 균 검출율을 보여 수동염색의 32%에 비해 6% 낮았으나 균 검출 기준을 '+' 이상으로 하면 수동과 자동의 경우 각각 22%, 23%로서 하나의 검체에 대해서만 차이를 보일 정도로 수동과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p>0.05).

**결 론**

결핵의 효과적인 치료와 관리를 위해서는 정확한 조기 진단이 매우 중요하다. 기존의 전통적인 진단 방법들이 갖는 여러 제한점으로 인하여, 최근에는 분자 생물학적인 방법 및 혈청학적인 방법들의 의존도가 점차 높아져 가고 있다[1,2]. 하지만

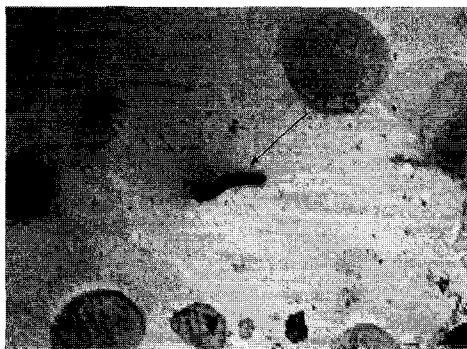


그림 7. 염색결과 (1000배 확대) (a) 자동 염색 (b) 수동염색  
Fig. 7. Results of stain (1000x magnification) (a) auto staining (b) manual staining

표 2. 자동과 수동의 염색 결과(N=91)

Table 2. Stained results of manual and auto staining (N=91)

종류	번호	수동염색	자동염색
Direct (N=37)	1~30	-	-
	31	+	+
	32	실4	-
	33	++	++
	34	+	++
	35	++	++
	36	실3	+
	37	+++	+
Indirect (N=54)	1~32	-	-
	33	실5	실1
	34	실7	실3
	35	+	+
	36	실7	실5
	37	+	+++
	38	++	+
	39	++	+
	40	+	++
	41	+	+
	42	+	++
	43	실5	+
	44	+	++
	45	+	-
	46	실1	-
	47	+	+
	48	실7	-
	49	+	+++
	50	실4	-
	51	+	+
52	++	++	
53	++	++	
54	++	++	

아직까지도 결핵의 진단에 있어서 표준 진단 방법은 도말 검사와 배양 검사이다[1,5]. 각종 검사 방법의 비교에 있어서 중요한 true positive는 결핵 진단에 있어서 예민도가 90% 내외 이면서 100%의 특이도를 갖고 있는 배양 양성인 경우가 정확하다고 할 수 있다[1,2]. 그러나, 배양 검사방법은 복잡하고 결과를 얻는데 8주 정도의 시간을 필요로 한다는 단점을 가지고 있다[2].

개발한 자동염색기를 사용할 경우, 수동과 자동의 측정 결과의 일치율이 95%로 배양을 하지 않고 직접 도말 검사로 측정이 가능하였다. 그리고, 검사자의 숙련도와 상관없이 일정하게 염색되며 균 검출을 또한 기존의 검사실에서 10년 이상의 경험을 가진 검사자가 시행한 수동염색과 통계적으로 유의한 차

표 3. 수동과 자동염색에 의한 결핵균 검출율

Table 3. Detection rates of tubercle bacilli by manual and auto staining (N=91)

종류	결과	수동염색(%)	자동 염색(%)
Direct	양성	18.9 (=7/37)	16.2 (=6/37)
	+ 이상	13.5 (=5/37)	16.2 (=6/37)
Indirect	양성	40.7(=22/54)	33.3(=18/54)
	+ 이상	27.7(=15/54)	27.7(=15/54)
Total	양성	31.9(=29/91)	26.4(=24/91)
	+ 이상	22.0(=20/91)	23.1(=21/91)

이를 보이지 않았다. 환자로부터 당일 얻은 객담을 자동 염색기로 염색하여 검사자의 숙련도에 상관없이 결핵균 검출을 30분 이내에 확인할 수 있다는 점이 결핵 진단에 상당한 도움을 줄 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. D. Bleed, C. Watt, C. Dye, Global Tuberculosis Control -WHO Report 2001. Geneva, Switzerland:2001. Report No.:WHO/CDS/TB/2001.287
2. 김상재, "결핵균 진단", 결핵 및 호흡기 질환, 제45권, 제4호, pp. 675-686, 1998
3. 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
4. D. Schlossberg, Tuberculosis, 3rd ed., New York, Springer-Verlag, pp. 95-106, 1994
5. Akhtar et. al., Technical Guide for Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy. International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases. 5th ed. 2000. p.1-20
6. C.L. Cardoso, L.R. Giacomelli, C. Helbel, J.J. Sant'Ana, F.M. Martins, and A.M. Barreto, "Survival of tubercle bacilli in heat-fixed and stained sputum smears", Mem. Inst. Oswaldo. Cruz., Vol. 96, No. 2, pp. 277-280, 2001
7. 김상재, 배길한, 황해도, "객담내 결핵균 검출방법의 효율성 비교", 결핵 및 호흡기 질환, 제36권, 제4호, pp. 354-361, 1989
8. V. Sticht-Groh and F. Boillot, "External quality control of direct sputum-smears from Sierra Leone, West Africa", Tubercle Lung Dis. Vol. 74, No. 6, pp. 409-11, 1993
9. 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*", Mol. Cell. Probe., Vol. 12, No. 4, pp. 207-211, 1998
10. Comfile Technology, PICBASIC databook, Seoul, Comfile Technology, 1998
  11. H.L. Rieder, T.M. Chronde, H. Myking, R. Urbanczik, A. Laszlo, S.J. Kim, A.V. Deun, and A. Trebuccq, The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network, Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, pp. 13-24, 1998