

결핵균 배양에 대한 배양촉진물질(CPI-107)의 효과

김승철¹ · 모놀도로바 세짐² · 전보영^{2,3*}

연세대학교 의과대학 면역질환연구소¹, 연세대학교 소프트웨어 디지털헬스케어융합대학 임상병리학과², (주)원헬스프런티어³

Effect of culture-promoting ingredients (CPI-107) on the culture of *Mycobacterium tuberculosis*

Seung Cheol Kim¹, Sezim Monoldorova², Bo-Young Jeon^{2,3*}

¹Institute for Immunology & Immunological Disease, Yonsei University College of Medicine, Seoul 03722, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Software and Digital Healthcare Convergence, Yonsei University, Wonju 26493, Korea

³One Health Frontier Co. Ltd, Wonju 26493, Korea

Received December 6, 2022

Revised January 3, 2023

Accepted January 3, 2023

Corresponding author:

Bo-Young Jeon

E-mail: bojeon@yonsei.ac.kr

https://orcid.org/0000-0002-4314-216X

Mycobacterium tuberculosis complex (*M. tuberculosis* complex) is a causative agent of contagious chronic disease in a wide range of mammalian hosts, mainly cattle, goat, pigs, wildlife, and humans. The definite diagnosis of tuberculosis is made based on culture of *M. tuberculosis*, but it takes a long time. In the present study, we analyzed whether the detection time of *M. tuberculosis* could be reduced when cultured in the medium containing the culture-promoting ingredients-107 (CPI-107) using the BacT/Alert 3D system, an automatic culture system. The time to detection (TTD) tended to decrease as the added concentration of CPI-107 increase. In the case of low numbers of *M. tuberculosis*, it decreased by 21.0% at 1.2 mg/mL of CPI-107 and by 15.9% in the case of high numbers of *M. tuberculosis*. In the culture using clinically isolated *M. tuberculosis* strains, the shortening of the culture time by CPI was more evident. In conclusion, the detection time of *M. tuberculosis* was shortened in the medium added with CPI-107, and this could be used for isolation, culture and drug susceptibility test of *M. tuberculosis*.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis* complex), Culture-promoting Ingredients-107 (CPI-107), Time to detection (TTD), BacT/Alert 3D system

서론

결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex)은 소, 산양, 돼지, 야생동물 및 사람을 포함한 다양한 포유동물에서 만성 전염성 질병을 일으킨다. 결핵균군은 사람의 결핵 원인균인 *M. tuberculosis*와 가축과 야생동물의 결핵병을 일으키는 *M. bovis* 등이 포함된다(Orgeur와 Brosch, 2018). 그 외에 *M. africanum*, *M. orygis*, *M. microti*, *M. acnetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, 및 *M. mungi* 등이 이에 속한다. *Mycobacterium*은 배양에 소요되는 시간에 따라 저속배양균(slowly growing mycobacteria)과 신속배양균(rapidly growing mycobacteria)로 나누어지는 데, 저속배양균 그룹에

는 *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. goodii* clade, *M. kansasii* clade, *M. nonchromogenicum/terrae* clade, Mycolactone-producing mycobacteria, *M. simiae* clade 및 비분류 그룹이 이에 속하여, 보통 7일 이상의 배양시간이 소요된다(Beste 등, 2009). *M. tuberculosis* complex에 속하는 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*는 고체배지에서 배양하는 데, 약 4주 이상의 시간이 소요된다(Koch와 Mizrahi, 2018).

사람의 결핵은 전 세계적으로 발생하고 있고, 심각한 질병 중 하나로 여겨지고 있으며, 세계 인구의 1/3이 결핵에 감염되어 있는 실정이다(Park, 2016). 한국은 경제협력개발기구(OECD, Organization for Economic Cooperation and Develop-

ment) 국가 중 결핵 발생률과 사망률이 1위로 결핵으로 인한 질병 부담이 큰 국가이다(World Health Organization, 2022).

결핵에 대한 효과적인 관리를 하기 위하여, 결핵을 신속하게 진단하고 결핵에 대한 치료의 효율을 높이는 것이다(Bird 등, 1996). 결핵에 대한 제시한 검사지침에 따르면, 결핵균에 대한 실험실적 검사는 결핵균에 대한 도말검사(smear test for tubercle bacilli), 결핵균의 분리배양 및 분리배양된 결핵균에 대한 약제내성검사로 이루어진다(Denniston 등, 1997; Kim 등, 1999). 결핵균에 대한 항산균도말염색검사(acid-fast bacillus stain, AFB stain)은 신속하게 결과를 도출할 수 있는 장점이 있으나, 결핵균 검출에 대한 민감도가 상당히 낮을 뿐만 아니라 생균과 사균을 구분할 수 없는 단점이 있다. 결핵균을 검체에서 분리, 배양하는 방법이 결핵에 대한 확진법으로 사용되고 있으며, 또한 배양된 결핵균을 이용하여 약제내성검사를 실시할 수 있다(Park 등, 2002). 결핵에 대한 핵산증폭검사를 실시할 경우, 결핵균을 신속·정확하게 검출할 수 있고, 항결핵약제인 리팜핀(Rifampin)에 대한 내성을 신속하게 확인할 수 있다(Hoek 등, 2011). 하지만, 다른 항결핵약제에 대해서는 핵산증폭검사로써 검사할 수 없거나 정확도가 낮아서 정확한 항결핵약제내성검사를 위하여 결핵균을 분리·배양하는 것이 필수적이다(Machado 등, 2019).

결핵균을 분리·배양하는 것이 결핵검사에서 중요하지만, 배양시간이 4~6주 정도가 소요되며(Lee 등, 2005), 검체내에 많은 수의 결핵균이 존재할 경우 배양에 용이하지만, 적은 수의 결핵균이 존재할 경우 결핵균의 배양시간이 매우 길어지거나 분리가 되지 않기도 한다(Mok, 2016). 최근에는 액체배양시스템을 도입하여 결핵균의 배양시간이 약 2~3주로 단축되었다. 하지만 결핵균의 배양시간을 더 줄이기 위해서는 결핵균이 성장하는데 필요한 배지 성분 또는 배지의 조합을 개선하는 것이 필요하다.

결핵균의 배양시간을 단축하기 위하여 여러 시도가 있었다. Gruft와 Loder (1971)는 8%의 이산화탄소 농도에서 결핵균을 배양하였을 때 검체에서 결핵균 분리율이 증가한 것을 보고하였고, Siddiqi 등(1988)은 다양한 성분들을 평가하여 폴리옥시에틸렌분획(polyoxyethylene separate)가 결핵균 및 비결핵항산균에 대하여 배양시간을 단축할 수 있는 것을 보고하였다. 또한 셀레늄(selenium)을 배지에 첨가하였을 때 결핵균의 집락형성이 초기에 형성되거나 검출시간이 감소하는 것을 보고하였다(Jaquess 등, 1981; Kim 등, 2018).

본 연구에서는 결핵균의 배양시간을 줄이고자 세균성분추출물의 하나인 배양촉진물질(culture-promoting ingredi-

ents-107, CPI-107)을 이용하여 결핵균에 대한 유효성을 평가하였다.

재료 및 방법

결핵균주

결핵균 표준균주인 *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)와 임상검체에서 분리한 결핵균주들과 결핵약제에 감수성인 임상균주(Drug Susceptibility: DR) 3균주, 다제내성 결핵균주(Multi Drug Resistant: MDR) 3균주를 본 연구에 사용하였다. 결핵균주들은 Middlebrook 7H9 배지(BD BBL, Sparks, MD, USA)에 ADC Enrichment (BD BBL)를 10%되도록 첨가하여 배양한 후 -80°C에 보관하였으며, 결핵균 배양실험은 연세대학교 의과대학내 생물안전3등급 연구시설에서 실시되었다.

결핵균 배양 배지 및 배지성분

결핵균의 배양은 Middlebrook 7H9 (BD BBL)와 ADC Enrichment (BD BBL)를 첨가한 배지와 ㈜원헬스프린터(Wonju, Korea)에서 제공받은 CPI-107을 Middlebrook 7H9 배지에 첨가한 배지를 이용하여 결핵균의 성장을 측정하였다. CPI-107에 대한 정량은 Pierce BCA Protein Assay kits (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 제조사의 지침에 따라 albumin (BSA) standard를 이용하여 농도를 측정하였고, 표준시료와 단계별로 희석된 시료를 microplate well에 25 μ L를 분주한 다음, well에 BCA working agent 200 μ L를 추가한 후, 37°C에서 30분간 처리하였다. 마이크로플레이트판독기(plate reader, Thermo Fisher Scientific)로 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. BSA standard를 이용하여 표준 곡선을 그린 다음, 표준 곡선을 이용하여 시료의 농도를 계산하였다.

결핵균 배양 및 배양기간 측정

결핵균의 배양은 자동배양기기(BacT/Alert 3D; BioMerieux, Durham, USA)를 이용하였으며, 결핵균의 배양시간은 양성 탐지시간(time to detection; TTD)으로 측정되었다. BacT/ALERT[®] MB 배양병에 결핵균은 1 mL씩 분주하여 BacT/Alert 3D에 장착하여 배양을 실시하였다. 결핵균 표준균주 H37Rv를 최종농도 5.0×10^3 생균수(Colony Forming Unit, CFU)와 $1.5 \times$

10⁵ 생균수가 되도록 접종한 후 BacT/ALERT에서의 양성탐지되는 기간을 측정하였으며, CPI-107은 여러 농도(0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.2 mg/mL)로 첨가하여 배양기간을 비교분석하였다. 결핵균의 생균수는 배양액을 멸균된 생리식염수를 이용하여 10배씩 단계 희석한 후, 10% ADC (BD BBL)를 포함한 Middlebrook 7H10 고체배지에 배양하여 집락수를 측정하였다.

임상결핵균주를 이용한 배양기간에 미치는 영향

임상결핵균주를 이용하여 CPI-107의 결핵균 배양에 대한 영향을 조사하였다. BacT/ALERT[®] MB 배양병에 CPI-107 1.2 mg/mL, ADC (BD BBL) 500 µL 또는 CPI-107과 ADC를 동시에 첨가한 후, 약제감수성 결핵균주 3균주, 다제내성 결핵균주 3균주를 각각 5.0×10³ 생균수(CFU)로 접종하여 양성탐지시간(TTD)을 비교 분석하였다.

통계 분석

자료를 GraphPad Prism (versio 6.0; Sad Diego, CA, USA)을 이용하여 결과를 분석하였다. 각 군 간의 비교는 Student t-test를 이용하였으며, P값이 0.05미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

결핵균 H37Rv 표준균주에 대한 CPI-107을 이용한 배양기간 측정결과

결핵균 H37Rv 표준균주를 최종농도 5.0×10³ 생균수(Colony Forming Unit, CFU)와 1.5×10⁵ 생균수가 되도록 접종한 후 BacT/ALERT에서의 양성탐지되는 기간을 측정하였을 때, 각각 평균 9.5 검출일과 16.7 검출일이 소요되었다(Table 1). CPI-107을 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.9 mg/mL, 및 1.2 mg/mL의 농도로 BacT/ALERT[®] MB배지에 첨가하여 결핵균 H37Rv 주를 이용하여 배양을 실시하였다. 결핵균을 5.0×10³ 생균수로 접종한 경우에 CPI-107의 농도가 0.3 mg/mL인 경우 양성탐지기간이 평균 15.7일(15.1~16.2일)로 약 6%의 배양시간이 단축되었다. CPI-107의 농도가 1.2 mg/mL의 경우, 양성탐지기간이 평균 13.2일로 ADC를 첨가하였을 때보다 3.5일의 배양시간이 줄어 21%의 배양시간이 단축되었다. 결핵균을 고농도인 1.5×10⁵ 생균수로 접종한 경우에 CPI-107의 농도가 0.3 mg/mL인 경우 양성탐지기간이 평균 8.6일(8.5~8.8일)로 배양시간이 약 9.5% 감소되었다. CPI-107의 농도가 1.2 mg/mL의 경우, 양성탐지기간이 평균 8.0일로 ADC를 첨가하였을 때보다 1.5일의 배양시간이 줄어 약 16%의 배양시간이 단축되었다. 결핵균 배양에 사용된 CPI-107의 농도에 따라 양성탐지기간이 줄어드는 경향을 나타내었다. 접종된 결핵균의 농도에 따라 CPI-107의 효과가 차이가 나타났는데, 결핵균 저농도(5.0×10³ 생균수)에서 고농도(1.5×10⁵ 생균수)보다 양성탐지기간이 단축되는 것을 확인할 수 있었다. 임상검체에서는 적은 수의 결핵균이 존재하는 경우가 많으므로, 이후 실험에서는 임상검체와 유사한

Table 1. The results of cultivation of *M. tuberculosis* H37Rv with CPI-107

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (CFU)	Culture additives	Time to detection (days)	Reduction (%)
5.0×10 ³	ADC	16.5~16.9 (16.7)	-
	CPI-107 (0.3 mg/mL)	15.1~16.2 (15.7)	6.0%
	CPI-107 (0.6 mg/mL)	14.2~16.0 (15.1)	9.6%
	CPI-107 (0.9 mg/mL)	15.0~15.6 (15.3)	8.4%
	CPI-107 (1.2 mg/mL)	13.2~13.2 (13.2)	21.0%
1.5×10 ⁵	ADC	9.2~9.7 (9.5)	-
	CPI-107 (0.3 mg/mL)	8.5~8.8 (8.6)	9.5%
	CPI-107 (0.6 mg/mL)	8.5~8.5 (8.5)	10.5%
	CPI-107 (0.9 mg/mL)	8.2~8.5 (8.3)	12.6%
	CPI-107 (1.2 mg/mL)	7.8~8.2 (8.0)	15.9%

CPI-107, culture promoting ingredients-107 (One health Frontier, Wonju, Korea).

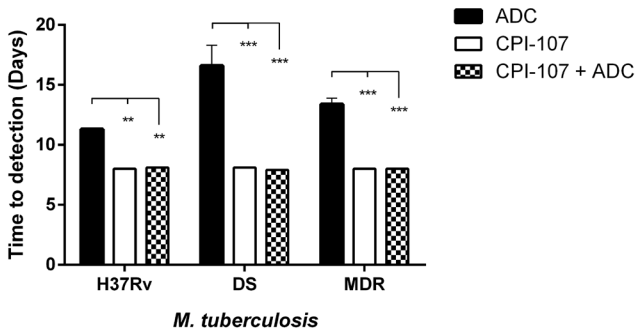


Fig. 1. The results of culture of *M. tuberculosis* clinical isolates with CPI-107. *M. tuberculosis* H37Rv, three drug-sensitive *M. tuberculosis* strains, and three multi-drug resistant *M. tuberculosis* strains were cultured using using the BacT/Alert 3D system (BioMeriux) in Middlebrook 7H9 medium containing 10% ADC (BD BBL), CPI-107 (1.2 mg/mL) or both. The asterisks denote statistically significant difference when values were compared with the control ADC group. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. DS, drug-sensitive; MDR, multi-drug resistant.

조건인 5.0×10^3 생균수로 연구를 진행하였다.

임상균주에 대한 CPI-107을 이용한 배양기간 측정결과

임상균주를 대상으로 결핵균배양배지에 첨가물로 사용되는 ADC (BD BBL)과 CPI-107을 각각 또는 동시에 첨가하여 배양시간을 측정하였다. BacT/ALERT® MB 배지에 10% ADC, CPI-107 (1.2 mg/mL)을 첨가하고, 결핵균 H37Rv균주, 약제감수성 임상균주 3균주, 다제내성 결핵균 3균주를 각각 5.0×10^3 생균수를 접종하여 BacT/ALERT에서 양성탐지되는 기간을 측정하였다(Fig. 1). 결핵균 표준균주인 H37Rv는 ADC를 첨가된 배지에 비하여 CPI-107을 첨가된 배지에서 양성탐지기간이 약 3일 감소되었다($P < 0.01$). 약제감수성 임상균주에서 ADC만 첨가된 배지에 대비하여 CPI-107이 첨가된 배지에서 배양기간이 8일 이상 단축되었으며($P < 0.001$), 다제내성 결핵균주에서 ADC만 첨가된 배지에 대비하여 CPI-107만 첨가된 배지에서 배양기간이 약 5일 단축되었다($P < 0.001$). 결핵균주를 배양할 때 ADC에 CPI-107을 같이 첨가하여 배양한 경우는 CPI-107을 단독으로 첨가한 배지에서의 양성탐지일에서 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$). 따라서, ADC와 CPI-107을 함께 첨가하여 배양하였을 때 배양에 대한 상승효과는 확인되지 않았다.

고찰

결핵균은 성장속도가 늦어 고체배지를 이용하여 결핵균을 분리배양하는 데 보통 4주에서 8주 정도 소요된다. 이는 결핵균을 분리·배양하여 진단하거나 결핵균을 이용한 연구에서 상당한 어려움으로 작용하고 있다. 본 연구에서는 결핵균 배양에 사용되는 배지성분을 조정하여 결핵균의 배양기간을 측정하여 보았다. 결핵균 액체배지인 Middlebrook 7H9 배지에 첨가물로 사용되는 ADC (BD BBL)는 비용이 고가이고 해외에서 수입에 의존하고 있어(Sabagh 등, 2012), 이를 대체하거나 배양기간을 추가적으로 단축시킬 수 있는 배지성분을 찾자 CPI-107을 결핵균 배양성분으로서의 성능을 평가하였다.

결핵균 표준균주에서 CPI-107을 다양한 농도에서 배양기간을 분석하였을 때, CPI-107의 농도가 높을 수록 결핵균 배양기간이 단축되는 것을 확인하였다. 또한 결핵균의 농도에 따라 CPI-107의 배양기간에 대한 차이도 나타났다. 결핵균을 고농도(1.5×10^5 생균수)로 CPI-107을 첨가하여 배양하였을 때 배양기간이 약 16% 감소하였지만, 저농도(5.0×10^3 생균수)로 CPI-107을 첨가하여 배양하였을 때 배양기간이 약 21% 감소하여 결핵균의 농도가 낮을 수록 CPI-107의 효과가 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 실제 임상검체에서 결핵균의 농도가 낮은 경우가 많아 더 유용성이 높을 것으로 기대된다.

임상분리균주인 약제감수성 임상균주와 다제내성 결핵균주를 이용하여 CPI-107을 첨가한 배지를 이용하여 배양시간을 측정하였을 때, ADC만 첨가한 배지에서의 양성탐지일보다 약제감수성 임상균주 균주에서는 약 8일, 그리고 다제내성 결핵균주에서는 약 5일 이상 단축되었다. 이러한 결과는 결핵균 배양에서 핵심성분으로 소혈장유래 알부민(Bovine serum albumin)이 주성분인 고가의 ADC를 CPI-107이 대체 할 수 있을 것이다.

본 연구결과에서 결핵균 표준균주인 H37Rv보다 임상분리균주들의 양성탐지기간이 3일~6일 정도 더 길었는데, 이는 실험실에서 오래동안 배양되어 적응된 결핵균 표준균주들보다 임상분리 결핵균들이나 약제내성이 높은 다제내성 결핵균의 경우 성장이 느려서 배양기간이 길어지는 경우가 많은 것으로 알려져 있다 (Cruciani 등, 2004; O'Grady 등, 2011). 그러므로 실제 결핵균을 검체에서 분리·배양할 때 상당히 도움이 될 것으로 기대가 된다. 또한 본 연구에서는 액체배양시스템의 하나인 BacT/Alert 3D를 이용하여 결핵균의 배양기간을 측정하였는데, 결핵균의 배양시간이 훨씬 많이 소용되는 고체배지에서 CPI-107을 첨가하여 배양하게 되면, 결핵균을 보다 신속하게 분리·배양할 수 있을 것이다 (Wallace 등, 2021). 추가적으로

결핵균의 분리·배양에 소요되는 시간 뿐만 아니라 약제내성검사에도 활용할 경우, 결핵의 진단 및 치료에 크게 기여할 수 있을 것이다.

결론

배양하는 데 많은 시간이 소요되는 결핵균의 배양시간을 단축하기 위하여 CPI-107을 첨가한 배양배지를 사용하여 결핵균의 배양기간을 자동배양시스템을 이용하여 분석하였다. CPI-107을 첨가한 경우, 저농도의 결핵균을 배양하였을 때는 양성탐지기간이 21%, 고농도의 결핵균을 배양하였을 때는 약 16% 감소하였다. 약제감수성 결핵균과 다제내성결핵균의 경우, CPI-107을 첨가하였을 때 기존의 배지첨가물인 ADC보다 월등하게 배양기간 단축되었다. 이로써 CPI-107은 기존의 배지첨가성분인 ADC를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 배양기간을 단축하여 결핵균의 분리·배양 뿐만 아니라 약제내성검사에도 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단 기초연구사업(NRF-2013R1A1A2059687, NRF-2016R1A6A3A11933077)과 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 가축질병대응기술고도화지원사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호: 122011-2).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Seung Cheol Kim, <https://orcid.org/0000-0002-7040-5850>

Sezim Monolodorva, <https://orcid.org/0000-0002-8869-7062>

Bo-Young Jeon, <https://orcid.org/0000-0002-4314-216X>

REFERENCES

Beste DJ, Espasa M, Bonde B, Kierzek AM, Stewart GR, McFadden J. 2009. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PLoS One* 4:

e5349.

Bird BR, Maxine DM, Huebner RE, Good RC. 1996. Changing practices in mycobacteriology: a follow-up survey of state and territorial public health laboratories. *J Clin Microbiol* 34: 554-559.

Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. 2004. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 42: 2321-2325.

Denniston MM, Bird BR, Kelly KA. 1997. Contrast of survey results between state and a cohort of non-state mycobacteriology laboratories: Changes in laboratory practices. *J Clin Microbiol* 35: 422-426.

Gruft H, Loder A. 1971. Enhancing effects of carbon dioxide on the primary isolation of acid-fast bacilli in a modified Lowenstein-Jensen medium. *Appl Microbiol* 22: 944-945.

Hoek KG, Van Rie A, van Helden PD, Warren RM, Victor TC. 2011. Detecting drug-resistant tuberculosis: the importance of rapid testing. *Mol Diagn Ther* 15: 189-194.

Jaquess PA, Smalley DL, Duckworth JK. 1981. Enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the presence of selenium. *Am J Clin Pathol* 75: 209-210.

Kim MN, Lee SH, Yang SE, Pai CH. 1999. Mycobacterial Testing in Hospital Laboratories in Korea: Results of a Survey of 40 University or Tertiary-care Hospitals. *Kor J Clin Pathol* 19: 86-91.

Kim SC, Kim JS, Monolodorova S, Cho JE, Hong M, Jeon BY. 2018. Effects of selenate and L-glutamate on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Kor J Vet Serv* 41: 239-244.

Koch A, Mizrahi V. 2018. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 26: 555-556.

Lee KE, Park DS, Lee YJ, Cho JH. 2005. Effects on Detection Rate and Turnaround Time by Changes in the Mycobacterial Culture and Identification Methods. *Kor J Lab Med* 25: 46-52.

Machado D, Couto I, Viveiros M. 2019. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes

- to genomes. *Infect Genet Evol* 72: 93-112.
- Mok J. 2016. Recent Advances in Diagnosis and treatment of Tuberculosis. *J Kor Soc Health-Syst Pharm* 101-110.
- O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, Kapata N, Bates M, Hoelscher M, Zumla A. 2011. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 17: 134-141.
- Orgeur M, Brosch R. 2018. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Curr Opin Microbiol* 41: 68-75.
- Park JS. 2016. Issues Related to the Updated 2014 Korean Guidelines for Tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 79: 1-4.
- Park SK, Kim SC, Kim DM, Lee CW, Kim Y, Cho SN. 2002. Fully Automated Liquid Culture System Compared with Lowenstein-Jensen Solid Medium for Rapid Recovery of *Mycobacteria* in Sputums. *Tuberc Res Dis* 53: 635-643.
- Sabagh BP, Souto Ada S, Reis LM, Silva SA, Pereira DC, Neves Mde C, Pinheiro RR, Duarte RS, Miyazaki NH, Bôas MH. 2012. Comparative study with two different enrichments in the culture media used in the disinfectant efficacy assay. *J Microbiol Methods* 88: 255-62.
- Siddiqi SH, Libonati JP, Carter ME, Hooper NM, Baker JF, Hwangbo CC, Warfel LE. 1988. Enhancement of *Mycobacterial* Growth in Middlebrook 7H12 Medium by Polyoxyethylene Stearate. *Curr Microbiol* 17: 105-110.
- Wallace E, Hendrickson D, Tolli N, Mehaffy C, Peña M, Nick JA, Knabenbaur P, Watkins J, Simpson A, Amin AG, Chatterjee D, Dobos KM, Lahiri R, Adams L, Strong M, Salfinger M, Bradford R, Stedman TT, Riojas MA, Hazbón MH. 2021. Culturing *Mycobacteria*. *Methods Mol Biol* 2314: 1-58.
- World Health Organization. 2022. Global tuberculosis report 2022. Geneva: WHO 2022.