

GREEN VET NEWSLETTER

04

NOVEMBER



ABOUT CONTENTS

조직 검사

조직 검사실은
사실 화학검사실?

미생물 검사

미생물 검사의
기본 특성 및 채취 방법

[조직 검사] 조직 검사실은 사실 화학검사실?

조직 검사실은 사실 화학 검사실?!

조직 검사에 특수염색 100% 활용하기

학부시절 조직학과 병리학을 배우면서 광학 현미경을 처음 들여다보았을 때, 졸업 후 수의사가 되면 조직병리학을 더 공부하겠다고 결심한 순간이 있습니다.

한 개의 연골세포 안에서 보이는 연하고 탁한 쪽빛에서 짙고 맑은 푸른빛으로의 변화, 비만세포가 가진 보라빛과 호산구의 핑크빛 과립, 적혈구 안에서도 미묘한 붉은빛의 그라데이션... 흑백으로만 배우던 어려운 수의학이 알록달록하게 변한 순간입니다.

선홍색의 적혈구(헤모글로빈), 짙은 갈색의 멜라닌색소, 헤모시데린, 리포푸신, 빌리루빈과 같이 몸 안에서 생성되는 내인성 색소를 지니지 않은 한, 동물의 세포와 조직은 대체로 투명합니다. 다시 말해 아무 처리도 하지 않은 동물의 조직을 현미경으로 관찰하면, 세포와 조직의 대략적인 형태만 아지랑이처럼 보이게 됩니다. 이런 투명한 조직들이 어떻게 저를 소동물 조직병리 수의사가 되도록 사로잡았을까요? 바로 "Histochemistry" 덕분입니다.

그리스어로 "Histo"는 "조직"을 의미하고, Histochemistry는 "조직화학"으로 직역됩니다. 조직화학은 세포와 조직을 구성하는 성분들, 세포 소기관의 화학적인 성질 차이를 이용해서 투명한 세포를 시각화해주는 방법을 총칭하고, 우리에게 익숙한 헤마톡실린과 에오신(Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색도 대표적인 조직화학에 속합니다. 1770년에 Hill이 Carmine 염료를 사용하기 시작하여 1838년에는 Ehrenberg가 미생물 연구에 Indigo 염료를 도입하였고, 현재까지도 원충 염색에 Ehrenberg의 염색법이 활용되고 있습니다. 우리가 잘 아는 Hematoxyline은 1865년에 처음 사용되었고, 오랜 기간 많은 염료들이 미생물학과 생물학, 의학 분야 연구를 위해 개발되고 개선되어 왔습니다." 이번 뉴스레터의 조직검사실 기사는, 사실은 화학검사실이라고 할 수 있는 그린벳 조직검사실에서 제공하는 여러 가지 알록달록한 조직화학 "특수 염색"을 소개해 드리고자 합니다.

특수염색은 일상적인 H&E 염색만으로 정확하게 진단하기가 어려울 때 보조 수단으로 이용하거나, 특정 질환이 의심될 때 확진하기 위해서 추가로 수행할 수 있습니다. 조직검사실은 여러 특수염색 시약과 프로토콜을 보유하고 있습니다. 아주 다양한 특수염색법들이 있지만, 그 중 가장 자주 사용하는 특수염색법은 Gram, Acid-fast, PAS, Warthin-Starry, Giemsa, Toluidine blue, Trichrome Masson, Rhodanine copper, Congo Red, Alcian blue stain입니다.

세균을 보고 싶을 때, Gram stain과 Acid-fast (Ziehl-Neelsen) stain

표재성 농피증, 간이나 신장의 농양, 기타 장기의 급성/만성 염증.

세균 감염은 다양한 질환과 조직의 병리적인 변화들을 일으킵니다. 그런데 세균은 세포에 비해 아주 작거나 가늘어서, 특히 중증의 염증이 발생하여 염증세포 밀도가 높거나 섬유화가 심하게 발생한 부위에서는 H&E염색으로는 발견하기 어려운 경우가 많습니다. 이럴 때 Gram stain을 이용하는데, 배경 세포와 조직은 연하게, 세균은 진한 색으로 대비시켜 주는 동시에 그람 양성균과 음성균을 구분해 줄 수 있는 유용한 염색법입니다. 특히 피부나 피하, 그리고 간, 신장, 폐와 같은 내부 장기에 염증이 발생한 경우에 염증 세포의 종류나 패턴이 세균 감염이 강력하게 의심될 때에 조직검사(H&E)와 동시에 진행하거나, 조직검사 후에 추가 검사하실 것을 추천하고 있습니다.

Gram stain

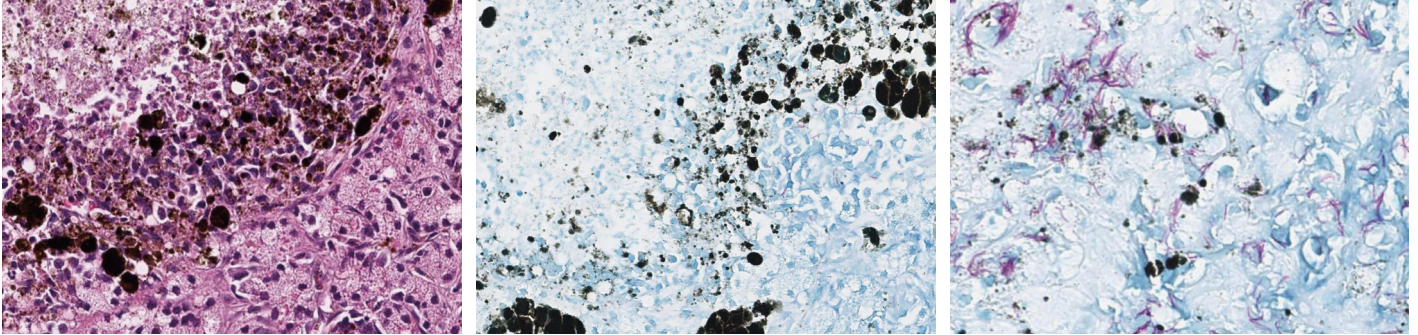
그람 양성/음성 균을 확인하는 가장 기본적인 염색

이럴 때 추천해요 ▶ 세균성 염증이 강력하게 의심되는 조직 소견인데, H&E 염색만으로는 세균을 확인할 수 없는 경우에 진행합니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ 세균 검사의 경우 배양검사가 민감도가 더 높고 배양-동정이 이루어져야 세균의 종류를 특정할 수 있습니다.

염색 후 조직에서 세균이 보이지 않았다고 해서 세균 감염이 완전히 배제되는 것은 아닙니다.

Gram stain 이외에 항산성균(Acid-fast)은 Ziehl-Neelsen stain으로 확인할 수 있습니다. 대표적인 세균으로 마이코박테리아(Myobacteria)가 있는데, 마이코박테리아는 세포 내부에서 증식하여 일반 미생물 검사로는 배양이 되지 않기 때문에 특히 유용한 방법입니다. 대학원시절 지역 동물원과 일을 하면서 다양한 야생동물의 사인을 밝히기 위한 부검과 조직병리검사를 진행하곤 했는데, 특히 조류나 파충류의 경우 감염에 의한 폐사가 많았습니다. 최근에 멸종위기종인 개구리가 폐사하면서 폐사 원인을 확인하기 위해 조직검사실로 간조직이 의뢰되었습니다. 다양한 종의 조직을 공부했지만 양서류의 조직은 생소했는데, 간에 발생한 다발성 육아종성 염증이 주요 소견이었습니다. 아주 가늘어서 섬유화된 부위의 섬유소와 섞여 H&E염색으로는 확인되지 않았던 항산성균을 Ziehl-Neelsen stain을 통해 확인할 수 있었습니다.(사진 1)



〈사진 1〉 Frog, Liver, H&E; Ziehl-Neelsen stain

Ziehl-Neelsen stain은 특히 피부나 피하, 기타 내부 장기에 육아종성 결절성 염증이 발생했을 때 항산성균이 있는지 확인하기 위해 조직검사와 동시에 진행하거나, 조직검사 후에 추가 검사하실 것을 추천하고 있습니다.

항산균은 미생물 검사로 동정이 어려운, 배양이 까다로운 균이기 때문에 조직검사가 민감도가 높은 검사법은 아니지만 유용한 검사법이 될 수 있습니다.

Acid-fast (Ziehl-Neelsen stain)

마이코박테리아를 포함한 항산성균을 확인할 수 있는 염색

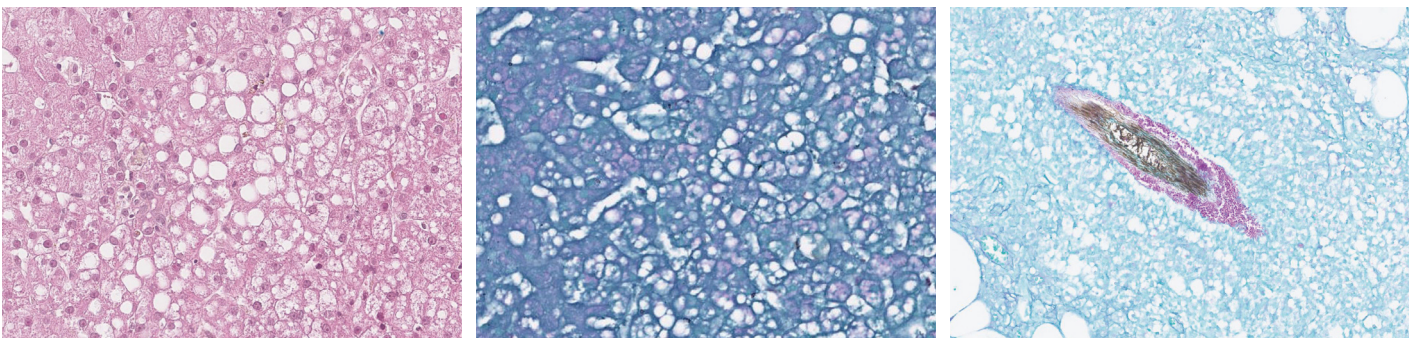
이럴 때 추천해요 ▶ 육아종성 결절성 염증이 무균성인지, 항산성균 감염에 의한 염증인지 감별해야 하는 경우에 진행합니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ 마이코박테리아는 배양이 어려워서, 특수염색 조직검사로 항산성균이 확인되더라도 배양 검사에서는 세균이 검출되지 않을 수 있습니다. 또한 의뢰된 조직 내 염증이라도 만성으로 오래 진행된 경우에는 조직의 염증과 과사가 심하게 진행되면 세균이 사멸하거나 용해되어 감염되었던 세균이 관찰되지 않을 수 있습니다.

곰팡이? 당침윤? PAS stain

Periodic acid Schiff (PAS) stain은 과요오드산(Periodic acid)으로 다당류를 산화시키고, 슈프시약(Schiff reagent)으로 산화된 다당류를 핑크빛 내지는 자홍색으로 발색 시키는 염색법입니다.²⁾

다당류를 핑크색으로 물들이기 때문에 간세포에서 관찰되는 공포가 부종성 변화인지, 글리코겐인지 확인하기 위해서 사용하기도 하고, 장이나 피부에 과사성, 화농성 육아종성 염증이 발생했는데 곰팡이 균사체가 있는지 확인해야 할 때에도 사용할 수 있습니다. 동물원이나 생태원에서 사육하는 조류의 경우 폐사 원인이 곰팡이성 폐렴인 경우가 많았는데, 이 때에도 PAS 염색으로 과사되어 균질한 호산성으로 변해버린 병변 내부에서 곰팡이 균사체를 쉽게 찾아낼 수 있었습니다.



〈사진 2〉 Canine, Liver, Glycogen-type vacuolar hepatopathy, H&E; PAS stain; Canine, Skin, Dermatophytosis, 육아종성 피부염의 염증 병소 내에서 뚜렷하게 염색된 곰팡이 균사체

이외에도 세포질에 다당류를 가지는 것을 특징으로 하는 과립세포종(Granular cell tumor)을 감별할 수 있는 간단하고 신속한 진단기법이기도 합니다. 그린벳 조직검사실에서는 PAS 염색 시에 대비염색(Counterstain) 시약으로 Light green을 사용하고 있는데, 해외로 의뢰되는 조직을 판독해 주는 미국수의병리학 전문의가 디지털 병리(DPS)를 통해 저희가 염색한 PAS 슬라이드를 확인한 후, "Your PAS stain is beautiful!" 이라고 감탄하며 프로토콜을 얻어 가기도 하였습니다.

PAS stain

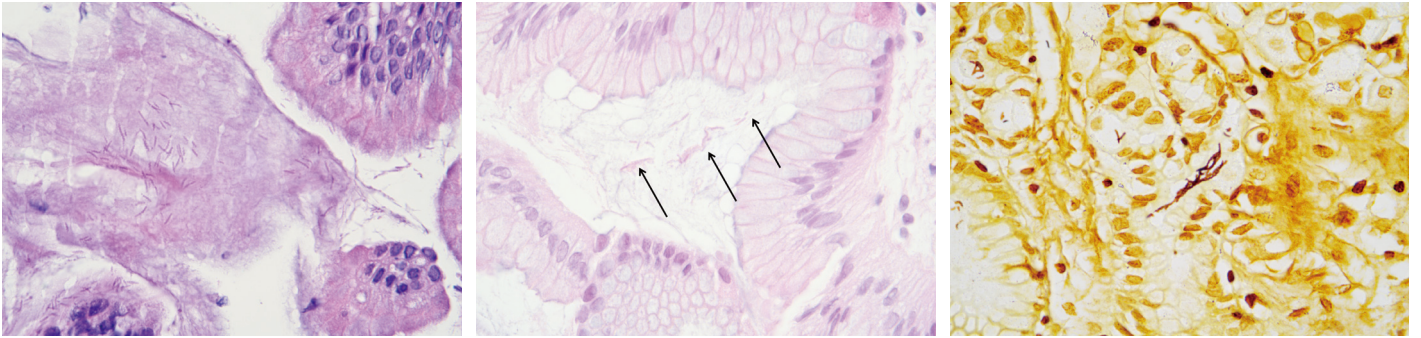
다당류를 핑크색으로 물들이는 염색법

이럴 때 추천해요 ▶ 염증과 과사가 심한 피부나 내부 장기 조직에서 곰팡이 균사체를 확인할 수 있습니다. 간세포 세포질의 글리코겐 축적을 확인할 수 있습니다. 구강에서 발생한 과립세포종을 확인하는 데 사용됩니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ 곰팡이 감염은 대부분 조직검사 후 PAS 염색으로 손쉽게 감별되지만, 세균과 마찬가지로 배양검사가 더 민감도가 높습니다.

나선균을 보기 위한 몸값 높은 도은 염색법, Warthin-Starry stain

반려동물 임상에서 가장 친숙한 나선균은 아마도 위 점막과 위생에 서식하는 헬리코박터(*Helicobacter* sp.) 균일 것 같습니다. 사람에서는 만성 위염과 위암의 발생에도 어느 정도 기여를 하는 것으로 밝혀졌지만, 개나 고양이에서는 상재균의 일종으로 여겨 지기도 합니다. 잦은 구토를 보이는 환축의 위 생검 검체 점막에서 많은 수의 헬리코박터균 집락이 보이면 헬리코박터 감염에 의한 만성 염증으로 진단할 수 있습니다.



〈사진 3〉 Canine, Stomach, *Helicobacter* spp., Endoscopic biopsy, H&E 1; H&E 2: Warthin-Starry stain

헬리코박터균은 특징적인 나선형 균체를 가지고 있고 일반적인 구균이나 간균보다 크기 때문에, 숙련된 조직병리수의사라면 H&E 염색 슬라이드로도 관찰하기가 크게 어렵지 않습니다. 위 생검 조직의 경우 헬리코박터균을 확인하기 위해 항상 Oil emersion field (x1000)로 꼼꼼하게 검사하고 있습니다. 첫 번째 사진과 같이 H&E 염색 슬라이드에서 뚜렷한 균체가 관찰된다면 헬리코박터 감염을 확진할 수 있고 별다른 추가검사는 필요하지 않습니다. 하지만 두 번째 사진과 같이 균이 소수이거나, 위 점막이 손상되고 점액이 과도하게 분비되어 탈락된 세포 찌꺼기나 점액 성분과 뒤섞여 세균이 있어도 잘 보이지 않는 경우에 특수한 조직화학이 필요합니다. 이외에도, DPS로 판독되는 국외 의뢰 조직의 경우 DPS 상에서는 미세초점을 조절할 수 없고 초고배율 관찰이 어렵기 때문에, 균체 확인을 위해 특수염색이 필요할 수 있습니다.

Warthin-Starry stain

나선균을 진한 갈색이나 검은 색으로 염색하는 은을 사용하여 몸값이 높은 염색법!

이럴 때 추천해요 ▶ 헬리코박터 감염에 의한 만성적인 구토 증상이 의심되는데, H&E 염색 슬라이드에서 균체가 잘 안보일 때 추천합니다.

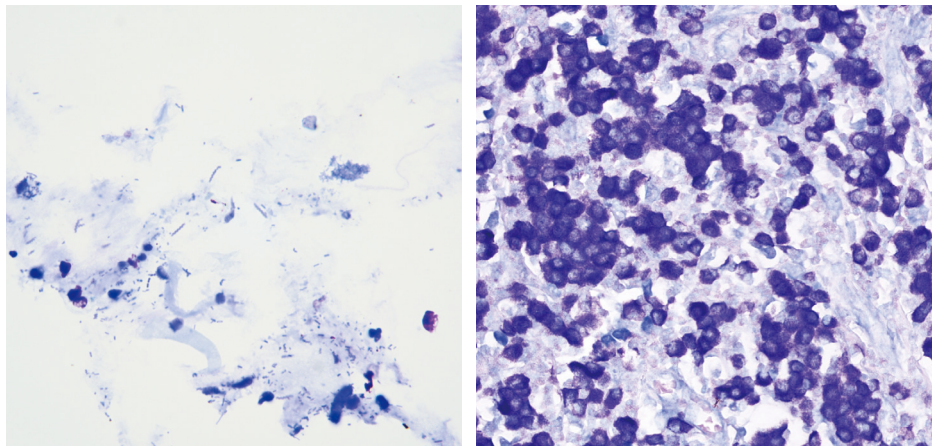
의뢰 시 주의하세요 ▶ 시간과 비용이 많이 요구되는 염색법으로, H&E 염색 슬라이드에서 헬리코박터균이 잘 보이는 경우에는 굳이 진행하지 않으셔도 됩니다.

Warthin-Starry stain은 이 염색법을 처음 개발한 과학자들의 이름(Aldred Scott Warthin과 Allen Chronister Starry)을 합쳐서 명명되었습니다. 은(Silver)성분을 이용하기 때문에 시약 비용이 다른 염색보다 비싸고, 항온수조로 꾸준히 열을 가해주며 발색을 수시로 확인해야 해서 손이 많이 가는 염색법이지만, 세 번째 사진과 같이 나선균을 진한 갈색 내지는 검은 색으로, 배경은 연한 황색에서 황갈색으로 대비시켜 줘서 점액 성분 사이에 숨어있는 균체를 쉽게 찾을 수 있도록 하는 유용한 진단법입니다. 산업 동물(특히 돼지)에서 중요한 세균인 *Lawsonia intracelularis* 균도 이 염색법으로 균체를 확인할 수 있습니다.

비용과 시간은 절약되고 비싼 염색법 못지않게 유용한, Giemsa stain

Giemsa stain은 모든 세포의 핵 염색질과 세포막을 눈에 띄게 만들어주고, 과립세포들이 가진 과립을 특정색으로 염색하고 이염색성 과립(비만세포 과립 등)도 뛰어나게 감별하여 특히 혈액 도말이나 골수검사 시에 세포의 종류를 감별하는데 유용합니다. 독일 화학자인 Gustav Giemsa가 처음 개발하였는데, 화학자였지만 의학과 미생물학 연구를 위해 염색법을 고안하였고, 처음에는 말라리아 원충을 염색하기 위해 사용하며 차차 다른 기생충 관찰을 위해서도 조금씩 프로토콜이 개선되었습니다.⁴⁾

현재는 주로 혈액도말표본에 사용되지만, 조직검사실에서는 위 내시경 검체에서 헬리코박터균을 확인하고, 피부나 비장, 장과 같은 내부 장기 조직에서 비만세포 과립을 관찰하기 위해 사용하고 있습니다.



〈사진 4〉 Canine, Stomach, *Helicobacter* spp., Endoscopic biopsy, Giemsa stain; Canine, Skin, Mast cell tumor, Giemsa stain

헬리코박터균 검출을 위한 Warthin-Starry stain은 비용과 시간, 인력이 다른 염색보다 더 많이 요구되기 때문에, 인의 분야에서는 내시경 검체에서 Giemsa stain을 더 많이 이용하고 있습니다. 은 성분을 이용해 균체를 짙은 갈색으로 보여주는 대신, Giemsa 시약을 이용하여 균체를 파란색으로 염색하여 시간과 비용이 절약되는 정말 유용한 염색법입니다. 또, 앞서 소개했듯이 이염색성 과립도 뛰어난 염색하여 비만세포를 감별할 때에도 자주 이용합니다. 이염색성에 대해서는 이어지는 Toluidine blue stain에서 조금 더 자세하게 설명 드리겠습니다.

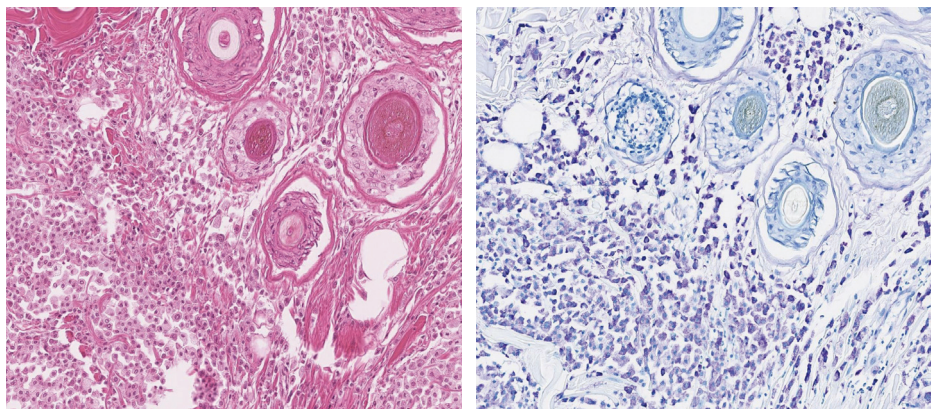
비만세포 과립, Toluidine blue stain으로 확인하세요

Toluidine blue는 호산성(Acidophilic) 염료로 세포의 산성 소기관인 핵산에 친화성이 있어 핵을 푸른색으로 염색해 주지만, 이 염료의 가장 큰 특징은 이염색성(Metachromatic property)입니다. 이염색성은 1875년에 Cornil, Jurgens와 Ranvier가 최초로 발견한 특성인데, 세포나 조직을 특정 염료로 염색할 때 본래 염료가 가진 고유의 색과는 다른 색으로 염색되는 성질을 의미합니다. 염료의 농도와 주위 환경에 따라서 서로 다른 파장의 빛을 흡수하기 때문에, 화학 구조의 변화 없이도 본래의 색과는 다른 색을 나타낼 수 있습니다.⁵⁾

조직이나 세포 내부에서 음이온 그룹의 밀도가 높은 부위에 염료의 양이온이 쌓이면서 파장의 이동을 단축시키기 때문인데, 이런 방식으로 염색되는 대표적인 물질은 뮤신(Mucin), 그리고 헤파린과 히스타민을 함유한 비만세포의 과립입니다. Toluidine blue 시약의 경우 시약 자체는 짙은 푸른빛을 띄는데, 이염색성을 가진 뮤신과 비만세포의 과립은 본래의 푸른빛이 아닌 보라색으로 염색이 됩니다.

Toluidine blue stain은 대표적으로 아래 나열된 이염색성 물질들을 확인하는 목적으로 사용할 수 있습니다.⁵⁾

- 결합조직의 뮤신, 특히 산성 뮤신
- 비만세포 과립
- 아밀로이드: 아밀로이드는 염료 색과 동일하게 염색되지만, 편광필터를 통해 관찰하면 Bright red birefringence를 보입니다.
- 내분비세포의 과립: 0.01% Toluidine blue로 염색 시 보라색에서 빨간색으로 염색됩니다.
- 헬리코박터균: 1% Toluidine blue로 염색 시 푸르게 염색되는 배경보다 확연히 더 짙은 푸른색(Dark blue)으로 염색됩니다.



〈사진 5〉 Canine, Skin, Cutaneous mast cell tumor, H&E; Toluidine blue stain

개와 고양이의 조직검사에서는 대부분 H&E 슬라이드만으로는 세포의 감별이 어려운 원형세포종양(Round cell tumor)에서 비만세포종을 감별하기 위해 사용하기 때문에, 그린벳 내부에서는 일반 조직검사시에 최종 결과가 나가기 전, 임상수의사가 특수염색을 의뢰하지 않았더라도 판독자 재량으로 Toluidine blue 염색을 진행하기도 합니다.

Toluidine blue stain

이염색성이 뛰어난 푸른빛의 염료

이럴 때 추천해요 ▶ H&E 염색만으로 감별이 어려운 원형세포 종양에서 비만세포종을 감별하고 싶을 때 추천합니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ Giemsa stain과 마찬가지로, 탈과립된 세포의 비율이 높으면 비만세포종도 Toluidine blue stain에 이염색상을 나타내지 않을 수 있습니다. 이 때는 C-kit (CD117) 항체를 이용한 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)이 권장됩니다.

Giemsa stain

모든 세포의 핵 염색질과 세포막을 뚜렷하게 염색하고, 과립세포 과립을 감별할 수 있는 간단한 염색법

이럴 때 추천해요 ▶ 조직검사에 활용할 때에는, 골수 Core biopsy 검체에 추천합니다.

이외에 위 내시경 검사 시에 헬리코박터를 보고 싶을 때 Warthin-Starry stain보다 더 빠른 시간 내에 결과를 받아볼 수 있고, 원형세포 종양에서 비만세포종을 감별하고 싶을 때에 이용할 수 있습니다.

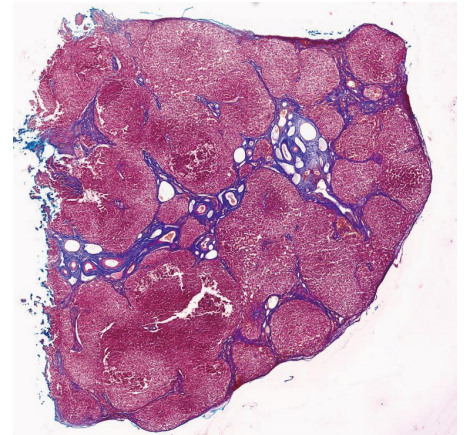
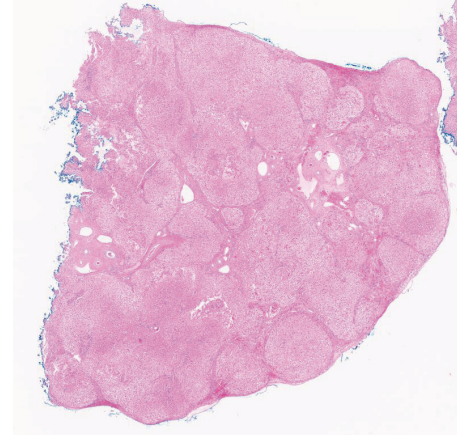
의뢰 시 주의하세요 ▶ 탈과립된 세포의 비율이 높으면 비만세포종도 Giemsa stain에 이염색상을 나타내지 않을 수 있습니다. 이 때는 C-kit (CD117) 항체를 이용한 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)이 권장됩니다.

조직을 세 가지 색상으로 물들이는 Trichrome Masson stain

Trichrome Masson stain은 이름에서도 알 수 있듯이, 세 가지 종류의 염료를 사용하는 특수염색 기법입니다. 염료의 분자 크기와 화학적 특성에 따라서 조직 내 성분들이 서로 다른 색으로 염색되는 특징을 이용합니다. 짙은 빨간색의 Biebrich Scarlet으로 호산성의 조직 구조물을 먼저 염색한 후에, Phosphoacid를 이용하여 콜라겐 섬유와 같이 투과성이 높은 조직에서 빨간색 시약을 탈락시키고, 탈락된 부위(콜라겐)를 파란색의 Aniline blue로 염색시켜 빨간색과 파란색의 극적인 색대비를 나타낼 수 있습니다. 세포의 핵은 갈색-파란색, 세포질은 붉은색, 근육과 콜라겐 섬유는 파란색으로 시각화해 주는 염색법입니다.

Trichrome Masson stain은 한 기관이나 조직을 구성하는 각 부위들을 대비시켜 주기 때문에, 조직형태학적인 연구에 유용합니다. 동물의 조직병리검사 시에는 만성으로 간이나 위, 신장 질환이 진행된 경우에 섬유화 정도를 평가하기 위해 주로 이용합니다.

(사진6)은 다결절성 변화를 나타내는 개의 간 조직인데, H&E 슬라이드에 비해서 많은 재생성 결절들 사이에 파란색의 콜라겐섬유가 잘 대비되어 상당히 섬유화가 진행된 상태임을 알 수 있습니다. 이외에도 콜라겐 기질을 생성하는 섬유세포 유래의 종양을 감별하고 싶을 때에도 진행할 수 있습니다.



〈사진 6〉 Canine, Liver, Regenerate nodules, H&E: Trichroma Masson stain

Trichrome Masson stain

결합조직을 극적으로 대비시켜 형태학적 연구에 유용한 염색법

이럴 때 추천해요 ▶ 만성 간과 신장 질환, 만성 염증이 진행된 장기의 섬유화 정도를 평가하고 싶을 때, 간질세포 종양 중 섬유세포 유래 종양을 감별하고 싶을 때 추천합니다.

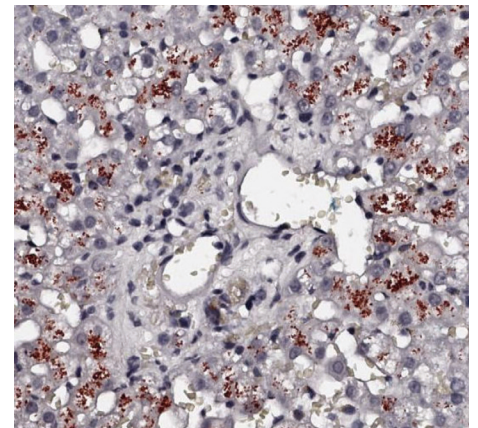
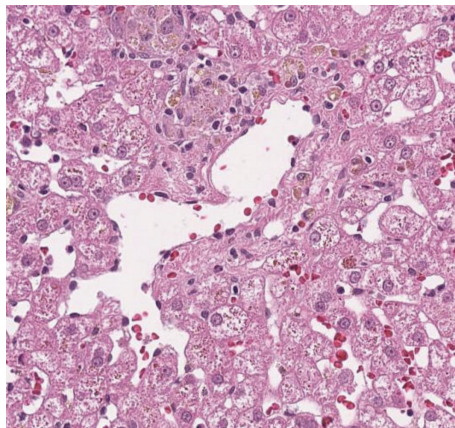
의뢰 시 주의하세요 ▶ 특별한 주의점은 없고 장점만 가진 염색법입니다. 하지만 섬유육종의 경우 미분화되어 조직학적 등급이 높을 때에는 콜라겐 기질을 소량밖에 생성하지 않아 염색되지 않을 수도 있습니다.

세포 내부에 축적된 구리(Copper)를 보고 싶을 때, Rhodanine Copper stain

반려동물의 혈액 검사에서 간수치가 높아졌을 때, 임상적으로 여러 검사를 통해서도 그 원인이 정확하게 찾아지지 않는 경우가 많습니다. 그럴 때에 간조직을 생검하여 조직병리검사를 진행하게 되는데, 조직상에서 간의 만성 염증과 반응성 변화가 관찰되고, 간세포의 세포질 안에서 미세한 과립이 확인되는 증례가 많습니다. 간세포는 정상적으로 다양한 세포소기관과 효소, 과립들을 가지고 있는데, H&E 슬라이드에서 노란색에서 갈색으로 염색되는 작은 과립들은 혈색소 유래이거나 담즙 성분일 수 있고, 간혹 구리가 축적된 경우에도 유사하게 관찰될 수 있습니다.

개에서 구리중독증은 과도한 양을 장기간에 걸쳐 섭취할 때, 담도계에 손상이 있을 때에 발생할 수 있고, 베들링턴테리어의 경우 유전적으로 구리 대사 이상을 나타내는 품종 소인이 있습니다.

간 손상의 원인이 구리 중독에 의한 것인지 확인하기 위해 진행할 수 있는 특수 염색이 구리염색(Rhodanine Copper stain)으로, 세포 내에서 구리가 결합하는 단백질에 친화성을 가지는 시약이기 때문에 사실은 구리 자체가 아닌 구리가 결합된 단백질을 염색하는 기법입니다.



〈사진 7〉 Canine, Liver, Copper toxicosis, H&E: Rhodanine Copper stain

(사진 7)은 개의 간조직 고배율 소견인데, H&E 염색 상에서 중심정맥 주위에 분포하는 간세포의 세포질에 적갈색의 미세한 과립들이 보이고, 황갈색의 과립을 탐식한 세포들도 관찰됩니다. 만성 간병증을 보이는 간이었는데, 구리염색을 추천하였고 대부분의 간엽에서 사진과 같이 적갈색의 과립들은 붉은색으로 염색되며 구리 과립으로 확인되어 Grade 2 정도의 구리 축적으로 인한 간병증으로 진단되었고, 황갈색의 과립은 붉게 염색되지 않아 혈색소나 리포푸신, 담즙유래 색소로 확인되었습니다.⁶⁾

구리염색은 일상적으로 진행하는 검사는 아니지만, 임상수의사가 간 생검 조직병리검사를 의뢰할 때에 동시에 의뢰하기도 하고, 세포질에 과립이 관찰되는 만성 간염증 조직검사 결과지를 받은 후에 추가 검사를 추천하여 진행하기도 합니다. 구리 축적이 확인되고 한 축의 품종이 베들링턴테리어라면 유전자 검사로 상염색체 돌연변이를 확인하시는 것이 좋습니다.

Rhodanine Copper stain

간세포 내부의 구리 축적 여부를 확인하는 특수염색

이럴 때 추천해요 ▶ 만성 간병변의 원인 중 구리 중독 여부를 확인하고 싶을 때 추천합니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ 구리 축적이 확인되더라도 소량인 경우에는 간병증의 원인으로 확진하지 않습니다. 구리 축적 유무와 대략적인 정도(Grade)는 확인 가능하지만 농도를 측정하는 정량 검사는 아니며, 구리 중독의 원인(과다 섭취, 간담도 이상, 유전질환)은 조직검사와 구리염색만으로는 확진할 수 없습니다.

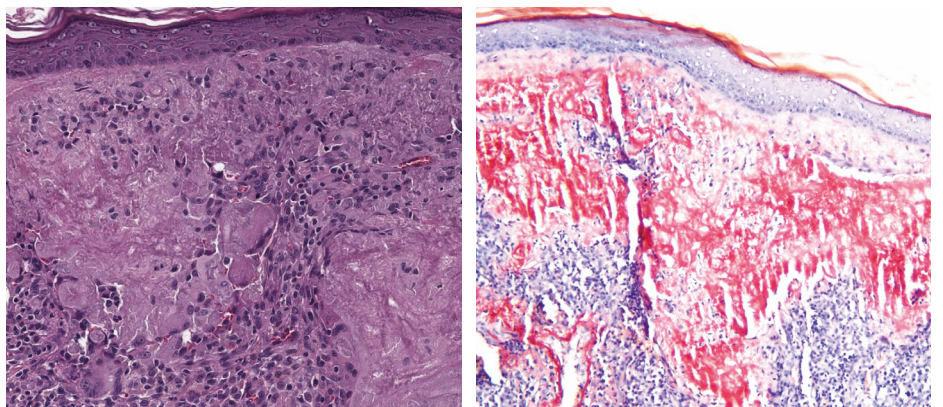
조직에 축적된 아밀로이드를 확인하기 위한 특수염색, Congo Red stain

아밀로이드는 신장, 간, 뇌, 비장을 비롯한 여러 장기의 세포 외부에 비정상적으로 축적되는 단백질입니다. 여러 기전에 의해 국소적으로 또는 전신적으로 아밀로이드가 축적될 수 있는데, 사람에서는 중추신경계에 축적되면서 신경퇴행성 질환을 유발하는 것으로 생각됩니다. 아밀로이드는 H&E 슬라이드에서는 호산성의 균질한 무정형 물질로 세포질 내부가 아닌 세포사이 공간, 세포외부에 축적되는데, 피브린양 변성과 유사하게 보이기 때문에 아밀로이드를 쉽게 구별해줄 수 있는 대표적인 염색법인 Congo Red stain입니다.

Congo Red 염료는 1883년에 화학자 Paul Bottiger가 pH 지시약을 개발하기 위해 여러 물질들을 혼합하는 과정에서 발견되었습니다. 그가 소속되어있던 Friedrich Bayer Company에서 개발한 'Congo'로 지칭되는 첫 번째 염료가 Congo Red이며, 이어서 동일 회사에서 Congo Rubine, Congo Cornith, Brilliant Congo, Congo Orange 등 많은 'Congo' 형제 염료들이 탄생하게 되었습니다.⁷⁾

이후에 이 염료는 동물의 장관계에서 산(Acid)을 검출하는 pH 지시약으로 이용되기도 하고, 1922년에 Bennhold가 처음으로 동물 혈관에 이 염료를 주입하여 유기체 내부에서 아밀로이드를 검출하는 데 사용하면서 현재까지도 in vivo, in vitro에서 아밀로이드를 검출하는 데 활용되고 있습니다.⁸⁾

(사진8)은 개의 피부에서 발생한 골수외(피부)형질세포종인데, 형질세포들이 밀집된 사이에 무정형의 균질한 물질들이 축적되어 있습니다. 동일 조직에 Congo Red stain을 진행하여 이 물질이 아밀로이드임을 확인할 수 있었습니다.



〈사진 8〉 Canine, Skin, Cutaneous plasmacytoma with amyloid accumulation, H&E; Congo Red stain

형질세포는 Light chain을 생성하여 분비하기 때문에 종종 국소적인 아밀로이드증을 동반하기도 하는데, H&E 슬라이드만으로 형질세포종과 조직구종을 감별하기 어려울 때 아밀로이드 축적 유무가 감별에 도움이 되기도 합니다. 이외에도 형질세포 유래의 악성 골수종양인 다발성 골수종(Multiple myeloma) 시에 여러 장기에 발생하는 아밀로이드증, 신장 사구체에 축적된 아밀로이드 등을 검출하기 위해 진행할 수 있습니다.

Congo Red stain

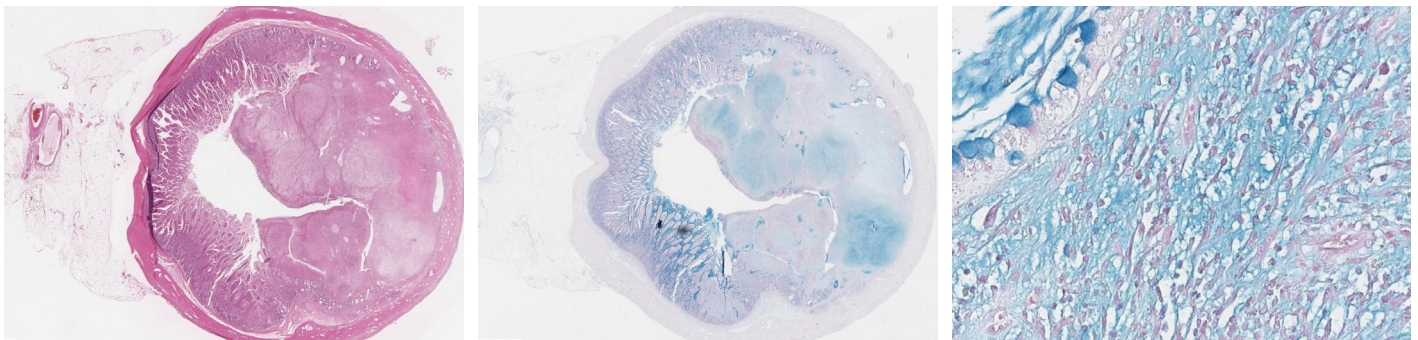
조직 내부, 세포사이에 축적된 아밀로이드 검출을 위한 특수염색법

이럴 때 추천해요 ▶ 조직병리검사 시에 특히 피부, 신장, 간, 비장에서 아밀로이드로 추정되는 물질이 확인될 때 추천합니다.

의뢰 시 주의하세요 ▶ 특별한 주의점은 없습니다.

뮤신 성분을 확인하기 위한 Alcian Blue stain

Alcian Blue 염료도 다른 대부분의 조직화학 시약과 마찬가지로 처음에는 섬유를 염색하기 위한 염료로 개발되었습니다. 사용되는 시약의 pH에 따라서 점액(뮤신) 성분을 구성하는 황이나 카복실기에 결합합니다. 염료가 함유한 구리 성분이 하늘색에서 파란색으로 뮤신을 염색하게 됩니다. 산성 뮤신만 염색하기 때문에, 중성 pH를 가진 뮤신은 PAS염색을 함께 염색하여 쉽게 감별할 수 있습니다. 점막 표면이나 세포 외부의 뮤신 이외에도 술잔세포(Goblet cell) 내부의 점액성분도 쉽게 확인할 수 있습니다.



<사진 9> Canine, Intestine, Intestinal myxoma, H&E; Alcian Blue stain (low-power); Alcian Blue stain (high-power)

(사진 9)는 개의 소장에서 발생한 간엽세포 유래의 악성종양입니다. 장에서 발생하는 악성종양은 대개 평활근육종(Leiomyosarcoma)이거나 위장관 기질종양(Gastrointestinal stromal tumor)인데요, 이 증례는 조직병리학적인 형태만으로 봤을 때 방추형세포 종양이지만 평활근육종은 아닌 것으로 판단되었고, 종양세포가 생성하는 기질을 확인하기 위해 Alcian Blue stain을 진행한 결과, 점액성 기질을 생성하는 섬유육종(Fibrosarcoma)의 유형인 점액육종(Myxosarcoma)으로 최종 진단되었습니다.

Alcian Blue stain

산성 뮤신을 검출하기 위한 특수염색

이럴 때 추천해요 ▶ 장관계의 점액을 확인할 때 또는 연부조직육종 중에서 점액육종을 감별하여 확진하고 싶을 때 추천합니다.

고배율 시야에서 세포 사이 기질들이 연한 파란색으로, 상피에 분포하는 술잔세포 내부는 짙은 파란색으로 염색된 것을 확인할 수 있습니다.

점액육종은 개와 고양이의 구강이나 피부에서는 종종 발생할 수 있지만 장관계에서는 비교적 드문 종류의 종양이기 때문에, Alcian Blue stain으로 간단하게 감별하실 것을 추천합니다.

그린벳 조직검사실에서 시행하고 있는 대표적인 10가지의 조직화학, 특수염색을 간단하게 소개해 드립니다.

저희 랩에서는 정확한 진단을 위해 국내 또는 국외 판독자가 꼭 필요하다고 생각되면 간단한 특수염색은 자체적으로 진행하여 제공해 드리기도 하고, 두 명의 한국 수의 병리전문의를 포함하여 세 명의 소동물 조직병리를 전공한 전담 수의사가 케이스에 따라 적재적소에 필요한 특수염색을 추가하여 진행하시기를 추천 드리기도 합니다.

특수염색은 보조적인 수단으로, 의뢰시에는 반드시 H&E 염색을 통한 조직병리검사가 선행되어야 합니다. 특수염색이 필요한 경우에는 조직병리검사 결과지의 판독자 코멘트나 별지의 추가 코멘트에 필요한 염색을 추천드리고 있고, 특정 염색은 조직이 아닌 세포 슬라이드로도 진행할 수 있습니다.

염색기법은 다양하지만 Rhodanine Copper stain을 제외하고는 모두 검사항목이 “특수염색”으로 동일하기 때문에, 검사 진행을 원하시는 경우 고객센터나 조직검사실로 문의주시면 진단 목적에 맞는 특수염색을 설명드릴 수 있도록 하겠습니다.

관련검사 항목(검사코드)

특수염색 (HP0016): 구리염색을 제외한 모든 특수염색

구리염색 (HP0020): Rhodanine Copper stain

[참고문헌]

- 1) Conn HJ. Biological Stains. New York, NY: Biotech Publications; 1940.
- 2) Wikipedia, Periodic acid-Schiff stain, https://en.wikipedia.org/wiki/Periodic_acid%E2%80%93Schiff_stain
- 3) Wikipedia, Warthin-Starry stain https://en.wikipedia.org/wiki/Warthin%E2%80%93Starry_stain
- 4) Barcia JJ. The Giemsa Stain: Its History and Applications, International Journal of Surgical Pathology; 2007
- 5) Sridharan and AA Shankar. Toluidine Blue: A Review of Its Chemistry and Clinical Utility, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology; 2012
- 6) Center SA, McDonough SP, Bogdanovic L. Digital Image Analysis of Rhodanine-tained Liver Biopsy Specimens for Calculation of Hepatic Copper Concentrations in Dogs. American Journal of Veterinary Research; 2013
- 7) Steensma DP. "Congo" Red: Out of Africa? Archives of Pathology & Laboratory Medicine; 2001
- 8) Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and Amyloids: History and Relationship. Bioscience Reports; 2018

글, 사진 조직검사Unit 임하영 수의사

[미생물 검사] 미생물 검사의 기본 특성 및 채취 방법

미생물 검사의 기본 특성

미생물 검사는 세균성 감염원을 동정하고, 치료에 유효한 항생제를 선택하는 데 활용됩니다. 이를 통해 세균성 감염증에서 치료 효과를 높이고, 항생제 오남용을 줄일 수 있는 최선의 진단과 처방을 하실 수 있습니다.

세균들은 각각 다양한 최적 성장 조건 및 배양 속도를 가지며 체외환경에서 온도나 pH 변화, 산소 노출, 건조 등의 환경 변화에 민감하게 반응하기 때문에 채취 및 수송 과정에서 활력을 잃고 사균되거나 오염균의 성장에 압도되기도 합니다. 이번 호에서는 이러한 특성이 미생물 검사 결과에 미치는 영향을 줄이고 검사 정확성을 높일 수 있는 방법에 대해 살펴보겠습니다.

채취 부위 별 검체 채취 및 수송 방법

개와 고양이로부터 채취한 검체에서 임상적으로 유의미한 미생물을 검출하는 데 영향을 미치는 요인에는 ① 세균의 감염을 시사하는 근거가 있는지, ② 충분한 양의 검체가 ③ 정확한 해부학적 부위에서 ④ 올바른 방법으로 채취되었는지, ⑤ 적절한 방법으로 보관 및 수송되었는지 등이 있습니다. 이를 토대로 검체 별로 채취 및 수송 단계에서의 검체 취급 원칙을 정리해보겠습니다.

Urine

최소 1mL 이상의 검체를 보내주시는 것이 좋으며, 방광천자 방법으로 채취된 Urine이 가장 적합한 미생물 배양 검체입니다. 방광천자가 불가능한 경우에는 무균적 카테터를 통해 채취할 수 있지만 요도 상재균으로 인한 오염 가능성이 있으므로 해석에 주의가 필요합니다. 방광 생검이나 요결석 검체도 미생물 검사 적합 검체입니다. 멸균 용기(Conical tube 등)에 보내주시거나, 주사기 속 공기를 빼고 비늘을 제거한 후 주사기 마개나 파라필름 등으로 잘 밀봉한 주사기 형태로 보내주시면 됩니다.

Body fluids

최소 1mL 이상의 검체 채취를 권장하고, 검체량이 많을수록 미생물 분리 가능성이 높아집니다. 개방되지 않은 상태에서 무균적으로 채취하거나 수술 중 채취할 수 있습니다. 인공 장치, 면역억제제 투여, 만성 질환으로 지속적인 치료를 받는 환자의 경우에는 피부 상재균에 의한 감염이 있을 수 있으므로 소수의 피부 상재균이 분리될 경우 그 해석이 중요합니다. 따라서 채취나 수송과정에서 오염되지 않도록 더욱 주의해야 합니다. 체액 검체도 소변 검체와 마찬가지로 멸균 용기나 잘 밀봉한 주사기 형태로 보내주시면 됩니다.

Airway specimens

비인두, 인후, 콧물 등의 상기도 검체는 채취가 용이하지만 상재균으로 오염될 가능성이 매우 높기 때문에 결과 해석에 주의가 필요합니다. 호기, 곰팡이 배양을 위해서 1mL 이상의 호흡기 세척액으로 의뢰하시는 것을 추천드리며, 세척액으로 링거액과 같은 완충액을 이용하면 양성 배양률이 더 높습니다. Swab 검체의 경우는 수송배지로 보내주시고, 세척액은 무균용기에 담아 보내주시면 됩니다.



<사진 10> 밀봉한 주사기와 Conical tube

Skin

미생물 검사에 가장 적합한 피부 검체는 세침흡입으로 채취한 농이며, 농피증의 경우 오염되지 않은 정상 피부를 통한 편지 생검 검체입니다. 가피나 표피 반고리반(Epidermal collarettes)을 피해 환부를 Swab해서 채취할 수도 있습니다. 귀에서 검체를 채취하실 때는 소독 전에 검이경을 통해 채취하거나 수직 외에도에서 채취할 수 있고, 가피나 부스러기를 제거한 후 Swab하여 보내주시면 됩니다. 잘 밀봉한 주사기 형태로 농을 보내주실 수 있고, Swab 검체는 채취 직후 수송배지에 담아서 보내주시면 됩니다. 생검 검체는 무균 용기에 담고, 건조하지 않도록 Saline(포르말린 불가)처리하여 의뢰해 주십시오.

Other tissues

조직 배양을 위해서는 생검이나 수술적으로 채취한 조직으로 의뢰 주시는 것이 가장 좋고, 수술 중 Swab하여 검체를 채취하는 방법도 가능하지만 불충분한 검체 양으로 인해 정확도가 떨어질 수 있습니다. 혐기 배양까지 의뢰 하시는 경우에는 직경 1cm² 이상 크기의 검체를 채취하여 혐기 환경이 잘 유지되도록 보내주시는 것이 좋습니다. 조직 검체는 무균 용기에 담고, 건조하지 않도록 Saline(포르말린 불가) 처리해주시면 됩니다. Swab 검체의 경우 채취 직후 수송배지에 담아 보내주시면 됩니다.



〈사진 11〉 Amies 수송 배지

Blood

혈액 배양은 검출 민감도가 높기 때문에 검체 채취단계부터 주의를 기울여 피부 상재균이 감염원으로 잘못 판독되지 않도록 해야 합니다. 원인균의 검출률을 높이고, 오염균과 원인균의 감별을 위해서는 시간 간격을 두고(30분-1시간) 2-3회 정도 각각 다른 부위에서 무균적으로 채취하여 각각 배양 검사를 진행하는 것이 가장 좋습니다. 혈액배양 양성률에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 혈액량으로, 혈액과 배지용액의 비율을 1:5에서 1:10 정도로 유지하되 최대한 많은 양의 혈액을 채취하는 것이 좋습니다(그린벳에서 제공하는 혈액배양병은 20mL 용량으로 혈액은 2-4mL가 적당합니다).

혈액은 채혈 직후에 입구를 잘 소독한 혈액배양병에 접종해야 하며, 접종한 혈액배양병은 상온에 보관하며 최대한 빠르게 검사실로 도착하여야 합니다.



〈사진 12〉 혈액배양병

검체 채취나 수송 방법 등에 대한 고민이 있으실 때 의뢰 전부터 상담이 가능하니 주저 마시고 검사실로 문의주시기 바랍니다. 또한 의뢰 단계에서 채취 부위, 채취 방법 등 자세한 검체 정보를 포함하여 감염이 의심되는 균, 원내 검경 결과에 대해 임상정보에 기재해 주시면 검사실에서 이를 토대로 해당 검체의 배양에 가장 적합한 배지나 배양 환경을 선택하는 데 큰 도움이 됩니다.

감사합니다.

[Reference]

Sykes, Jane E. *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Available from: Elsevier eBooks+, (5th Edition). Elsevier - OHCE, 2022.

Elizabeth Villiers, Jelena Ristic. *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*, 3rd Edition. Vol Third edition. BSAVA [British Small Animal Veterinary Association]; 2016.

Quinn, PJ., *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2011

글, 사진 진단검사Unit 권나영 수의사

