

Sodium polyanethol sulfonate의 혈액배양에서의 *Salmonella typhi* 분리에 대한 영향*

연세대학교 의과대학 임상병리과

정 윤 섭

=Abstract=

Effect of sodium polyanethol sulfonate on the isolation of *Salmonella typhi* from blood culture.

Yunsop Chong

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine

Blood is one of the most important clinical specimens for the isolation of bacteria. A rapid isolation and a high isolation rate of bacteria are very important in blood culture because bacteremic patients are mostly in grave condition. Various blood culture media which support growth of most fastidious bacteria are available commercially. However, growth of bacteria are frequently delayed because of antibacterial activity of blood.

Sodium polyanethol sulfonate (Liquoid) has been reported to inactivate the antibacterial substance and disrupt phagocytic cells. The beneficial effect of SPS is well recognized in the isolation of gram-positive bacteria. However, the effect does not seem to be prominent for gram-negative bacilli isolation mainly due to the rapidity of their growth.

It has been experienced with *Sal. typhi* that the growth is much slower than that of other gram-negative bacilli. For the rapid growth of the organism, use of bile broth has been recommended. Although *Sal. typhi* is the most frequently isolated organism at present, about one half of total isolates are other organisms and, in case bile broth is used, other media which support growth of these organisms should be used together. Fluid thioglycollate medium (FTM) which is always used in blood culture to isolate anaerobes is inferior to brain heart infusion (BHI) for the isolation of aerobes.

This study was done to determine the effect of SPS on the isolation of *Sal. typhi* from blood. During the Sep. 1973 to Sep. 1974 study period, 2460 blood cultures were made from the Severance hospital patients: BHI and FTM sets 1431 specimens, BHI with SPS (0.05%) and FTM sets 396 specimens, BHI and FTM with SPS sets 359 specimens, BHI and BHI with SPS sets 274 specimens.

* 이 연구는 1973년도 연세대 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

Mean incubation time required for the macroscopic detection of growth of *Sal. typhi* were 3.5 days on BHI and 2.7 days on BHI with SPS. The 0.8 day difference was statistically significant. On FTM the mean incubation time was 3.8 days while it was 2.9 days on FTM with SPS. The 0.9 day difference was statistically significant.

The result on BHI with and without SPS sets showed faster growth on BHI with SPS in 7 specimens and slower growth in one specimen and the remaining 12 showed growth at the same time. These specimens had mean incubation time of 3.2 days on BHI and 2.3 days on BHI with SPS. The 0.9 day difference was statistically significant.

This study indicates beneficial effect of SPS for the rapid isolation of *Sal. typhi* from clinical blood specimens.

서 론

Bacteremia는 여러가지 infection에서 볼수 있으며 blood culture는 etiologic diagnosis와 antibiotic의 선택을 위해 필요하게 된다. bacteremia인 환자는 대부분이 위중한 상태이므로 blood culture결과를 신속히 얻을 수 있어야 하지만, 혈액은 antibacterial activity를 가지고 있으므로 세균 증식은 늦어지는 일이 많다.

우리는 장티프스 환자 발생을 아직 많이 볼수 있으며, 이병의 진단을 위해 blood culture가 많이 이용되고 있다. blood culture에서의 *Sal. typhi* 증식은 Enterobacteriaceae 중 다른 species보다 느리다, Haebler와 Miles¹⁾가 sodium polyanethol sulfonate를 blood culture media에 첨가하면 blood의 antibacterial activity를 억제함을 보고한 이래, 이 약품이 세균의 배양 양성율을 높이고 증식에 필요한 배양기간도 단축시키미 보고되었다²⁻⁸⁾. 한편 blood의 antibacterial activity를 감소시키기 위하여는 다량의 media를 써서 희석시키기도 한다⁹⁾. blood와 media의 양의 비가 여러가지인 경우의 blood의 antibacterial activity와 그에 대한 여러 anticoagulant의 효과는 Evans와 Searcy¹⁰⁾에 의해 experimental blood culture에서 증명되었다

Clinical specimen에서 *Sal. typhi*를 분리할 때 blood와 media의 비가 1:10으로 적절한 경우의 SPS 효과는 보고되어 있지 않은 것으로 알고 있다. 이러한 경우의 SPS의 영향을 밝히기 위하여 이 실험을 하였다

실험재료 및 방법

배지는 brain heart infusion (BHI, Difco)와 fluid

thioglycollate medium (FTM, Difco)를 사용하였다. sodium polyanethol sulfonate (Liquoid, Roche)는 0.05%량을 배지에 첨가한 후 병에 분주하고 15 lbs, 15분간 멸균하였다. 배지는 다음 4종류의 set를 만들고 그중 한 set를 무작위로 사용하였다.

- ① BHI 50 ml와 FTM 50 ml.
- ② BHI with SPS 50 ml와 FTM 50 ml.
- ③ BHI 50 ml와 FTM with SPS 50 ml.
- ④ BHI 25 ml와 BHI with SPS 25 ml.

검사물은 1973년 9월 부터 1974년 9월 사이에 배양 의뢰된 세브란스병원 입원 및 외래 환자의 혈액이다. 접종된 혈액과 배지의 비가 1:10이 되게 하기 위하여 가능한한 10 ml를 채혈하였고 각 배지에 동량을 접종하였다. 배지 ④의 경우에는 2.5 ml씩 접종하였다. incubation은 37°C, in air에 하였고, 세균증식에 따른 배지의 변화 유무를 매일 1회 육안으로 관찰하였다. 증식된 세균의 동정은 통상방법에 따랐다.

성 적

실험기간중 2460건의 blood culture를 하였다. 이중 BHI과 FTM set (①)에 1,431건, BHI with SPS와 FTM set (②)에 396건, BHI과 FTM with SPS set (③)에 359건, BHI과 BHI with SPS set (④)에 274건을 배양하였다.

이 실험에서 1주일 이상 incubation 후에 증식이 발견된 경우도 소수 있지만, 대부분은 1주일 이내에 증식하였고, 또 1주일 이후에는 세균의 증식 없이도 broth가 혼탁되어, 육안적인 관찰로 세균의 증식을 정확히 알아내기는 어려우므로 1주일 이후에 증식한 검사물은 비교 대상에서 제외하였다.

Table 1. Comparison of required incubation time before bacterial growth was macroscopically detected. #

Media*	Total isolate	Incubation time (day)							Mean**
		1	2	3	4	5	6	7	
BHI with SPS	33 100%	1 3.0	16 48.5	9 27.3	5 15.2	2 6.1			2.7
BHI without SPS	67 100%		15 22.4	27 40.3	12 17.9	7 10.4	2 3.0	4 6.0	3.5
FTM with SPS	32 100%		13 40.6	11 34.4	6 18.8	1 3.1	1 3.1		2.9
FTM without SPS	52 100%		14 26.9	12 23.1	7 13.5	13 25.0	3 5.8	3 5.8	3.8

#The media showing growth after one week incubation were not included because, after that time, detection of growth by macroscopic observation was difficult due to turbidity of the broth.

*Media 50 ml, SPS 0.05%, Inoculum 5 ml of blood.

**BHI W/SPS vs BHI W/O SPS: $t=3.03$, $p<0.01$
FTM W/SPS vs FTM W/O SPS: $t=2.91$, $p<0.01$

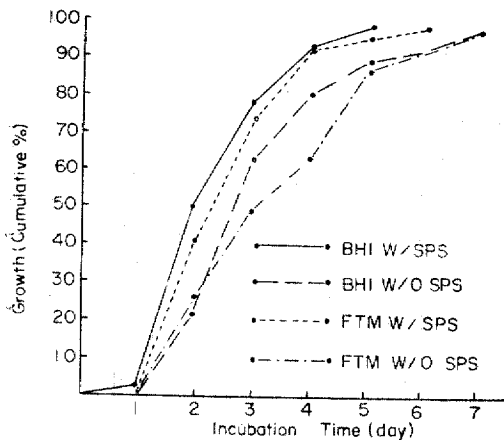


Fig. 1. Comparison of required incubation time before bacterial growth was macroscopically detected.

1). 배지 ①, ② 및 ③을 사용하여 얻은 결과를 배지 별로 나누어 보면 Table 1과 같다. BHI에는 67건의 검사물에서 *Sal. typhi*가 배양되었다. 증식발견 시기를 보면 2~5일 배양후에 대부분이 증식하였고 증식발견 빈도가 제일 많은 것은 3일이며 평균배양기간은 3.5일이었다. SPS 첨가 BHI에 증식한 것은 33건이었다. 1일후 증식이 1건 있었고 4일까지에 대부분이 증식하였으며 빈도가 제일 많은 것은 2일이었으며 평균 배양기간은 2.7일이었다. SPS 첨가로서 평균배양기간은 0.8일이 단축되었고 이 차이는 Student의 t test에 의하면

$t=3.03$, $p<0.01$ 로서 유의하였다.

FTM에서의 증식은 2~5일 배양후에 대부분이 발견되었고 평균 배양기간은 3.8일이었다. SPS 첨가 FTM에서는 2~4일 후에 대부분이 증식하였고 증식발견 빈도가 제일 많은 것은 2일이었다. 평균배양기간은 2.9일이었다. SPS 첨가로 단축된 배양기간은 0.9일이었으며 이 차이는 $t=2.91$, $p<0.01$ 로 유의하였다.

BHI와 FTM을 비교하면 SPS를 첨가한 경우이든 첨가하지 않은 경우이든 BHI에서 다소 빨리 증식하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

2). Blood specimen 하나를 SPS가 첨가된 것과 첨가 안된 BHI에 접종하므로써 SPS의 영향을 동일 검사물에서 비교하였다. 이와 같이 처리된 specimen 274개중에서 26개 검사물에서 *Sal. typhi*가 배양되었으며, 이중에서 1주일 이내에 두배지 모두에 증식한 것은 20건이며 이것은 specimen 별로 증식 시기를 비교하면 두 배지에 동시에 증식된 specimen이 12, SPS 첨가 BHI에 빠른것이 7, 느린것이 1건이었다(Table 2).

Table 2. Comparison of blood culture results on the paired media sets.

Media	Number of specimens			Total
	Same time	Faster	Slower	
BHI with SPS*	12	7	1	20
BHI without SPS	12	1	7	20

*25 ml of media received 2.5 ml of blood.

Table 3. Comparison of required incubation time before bacterial growth was macroscopically detected. #

Media*	Incubation time (day)							Mean**
	1	2	3	4	5	6	7	
BHI with SPS	20	2	14	2	1	1		2.3
	100%	10	70	10	5	5		
BHI without SPS	20		9	2	7	1	1	3.2
	100%		45	10	35	5	5	

The media showing growth after one week incubation were not included because, after that time, detection of growth by macroscopic observation was difficult due to turbidity of the broth.

*Media 25 ml, SPS 0.05%, Inoculum 2.5 ml of blood

** $t=2.66$, $p<0.05$

이 결과를 배지별로 비교해 보면 BHI에서는 2~4일 배양후에 대부분이 증식하였고 평균배양기간은 3.2일이었다. SPS 첨가 BHI에서는 1~3일 후에 대부분이 증식, 평균배양기간이 2.3일이었다. SPS 사용으로 인한 0.9 일의 단축은 $t=2.66$, $p<0.05$ 로 유의미한 차였다(Table 3).

고 안

Clinical bacteriology에서 취급하는 검사물 중에서 blood는 가장 중요한 것의 하나이다. blood에서는 몇 가지 pathogenic bacteria를 제외한 여러가지 세균이 분리될 수 있으므로 사용되는 배지는 fastidious bacteria의 증식도 가능케 하는 것이어야 하며, 흔히 BHI나 TSB 종의 한가지와 FTM이 이용된다.

Bacteremia시 blood 중의 세균수는 많지 않으므로 최소 10 ml의 blood를 채취하여 접종하며, 세균증식은 지연되는 경우가 있으므로 최소 2주일간은 배양을 계속한다. 그러나 배양 결과가 지연될 때 그 가치는 반감되고 만다. blood culture에서 세균 증식이 느린것은 주로 blood 자체의 antibacterial activity 때문이다. blood에는 여러가지 antibacterial substance가 들어 있고, 또 WBC는 blood culture media 중에서도 상당기간 phagocytic activity를 가진다¹⁰⁻¹⁷. 또한 blood culture media 종류에 따라서는 접종된 blood의 응고를 막지 못하는 경우도 있으며, 이런 경우 blood clot 중에 들어 있는 세균을 증식도 잘 안되고 증식하더라도 발견되기가 어렵다.

Blood의 antibacterial activity를 저지하기 위하여는 다량의 배지를 쓰는 방법과 anticoagulant를 쓰는 방법 중의 하나를 택해 쓰는 것이 보통이었으나^{6,9} 두가지를 결합 방법 즉 다량의 배지에 anticoagulant를 사용

하는 것이 좋은 방법임이 보고 되었다^{3,5,7,18}.

SPS는 anticoagulant이다. Sod. citrate¹⁸, EDTA^{3,4} 등 항응고제도 blood culture에서의 세균 증식을 촉진시키지만 세균에 따라서는 오히려 이들에 의해 증식이 억제되는 것이 있으므로 blood culture에 이용할수 없으며^{2-4,19,20}, heparin은 증식을 억제하지 않지만 고이고 autoclaving을 할수 없기 때문에 blood culture media에 첨가하기에는 부적당하다. 보통 쓰이는 농도의 SPS에 의해서는 증식이 억제되는 세균이 없으며 heparin보다 값싸고 autoclaving이 가능하므로 blood culture media에 첨가하기 적당한 것이다².

SPS는 혈액의 bactericidal activity와 WBC의 phagocytic activity를 억제하며, anticomplementary activity를 가지므로서 blood culture에서의 세균증식을 촉진하는 것으로 알려져 있는데² 그 효과는 gram-positive bacteria의 배양에 특히 뚜렷하다. Enterobacteriaceae는 SPS첨가 없이도 그 증식이 빠른 것으로 보고되어 있지만^{3,7}, *Sal. typhi*의 경우에는 그 증식이 느려서 gram-positive bacteria인 *S. aureus*보다도 긴 배양기간을 필요로 함을 경험하고 있다(Table 4).

아직도 우리는 typhoid fever 환자를 많이 볼수 있으며, 이 병의 진단을 위해 blood culture가 많이 쓰이고 있다(Table 5). *Sal. typhi*를 blood에서 배양하기 위하여는 bile broth가 좋으며, bile은 anticoagulant와 마찬가지로 blood의 antibacterial activity를 억제하므로서 *Sal. typhi*의 증식을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 근래 blood에서 배양되는 세균중에는 *Sal. typhi*가 가장 많지만 나머지 약 반은 다른 세균이므로 bile broth를 쓸 경우에는 nonselective media를 함께 사용해야 한다. anaerobic culture를 위해 사용되는 FTM에는 aerobic bacteria도 배양되지만 *Pseudomonas aeruginosa* 등은 배양성격이 좋지 않은 경우도 있으며, 또

Table 4. Required incubation time before bacterial growth was detected macroscopically in brain heart infusion.

Bacteria	Total isolate	Incubation time (day)							Mean
		1	2	3	4	5	6	7	
<i>S. aureus</i>	18 100%	1 5.6	8 44.4	5 27.8	4 22.2				2.7
<i>E. coli</i>	42 100%	10 23.8	25 59.5	2 4.8	3 7.1		1 2.4	1 2.4	2.2
Aerobacter-Klebsiella	28 100%	8 28.6	14 50.0	3 10.7		1 3.6	2 7.1		2.2
<i>S. typhi</i>	67 100%		15 22.4	27 40.3	12 17.9	7 10.4	2 3.0	4 6.0	3.5

Table 5. *Salmonella typhi* isolation from blood culture (1972 and 1973).

	Number of specimens	Number of patients
Total blood culture	5,277	
Bacteria isolation	675(100%)	369(100%)
<i>S. typhi</i> isolation	351(52.0%)	182(49.3%)

한 facultative bacteria의 경우에도 BHI에서 보다는 그 증식이 느린을 경험하고 있다.

Blood culture media에서 세균의 증식을 알아 내기 위하여는 배양기간중 매일 관찰하되 육안적으로 배지의 변화를 관찰하는 방법과 무조건 염색이나 subculture를 해보는 방법이 있다. 전자는 손쉽고 배지물 오염시킬 염려가 없으며 후자는 발견 시기가 좀 더 빠를수 있다. SPS의 효과를 시험함에 있어서 연구자에 따라서는 subculture를 자주하여서 그 차이를 비교하였으나 일반 실험실에서 환자의 검사물을 취급할때는 그러한 방법을 쓰기 어려움으로 이 실험에서는 통상 많이 쓰이는 전자의 방법으로 관찰하였다.

이 실험에서 *Sal. typhi*의 증식이 육안으로 관찰되기에 필요한 평균배양기간은 BHI에서 3.5일이고 FTM에서는 3.8일이었다. SPS를 첨가하면 BHI에서는 평균기간이 2.7일이었다고 FTM에서는 2.9이었다. SPS첨가로 인한 배양기간의 단축은 BHI에서는 0.8일 FTM에서는 0.9일이었다고 이 차이는 통계적으로 유의의 하였다.

한 검사물을 SPS가 첨가된 BHI과 첨가 안된 BHI에 접종하여 얻은 결과를 검사물 별로 비교하더라도 SPS첨가 배지에서 더 빨리 증식됨을 볼수 있었고 SPS첨가에 의하여서는 평균 배양기간이 3.2일에서

2.3일로 0.9일이 단축되었고 이차는 통계적으로 유의의 하였다. 즉 이 실험에서는 blood와 media의 비가 1:10으로 소위 적절한 경우에도 BHI나 FTM에 SPS를 0.05% 첨가함으로써 *Sal. typhi*의 평균배양기간을 0.8~0.9일 단축시킬 수 있었다.

SPS첨가로서 *Sal. typhi* 증식에 필요한 배양기간이 단축된 것은, blood를 media로 10분의 1 농도로 희석한다하더라도 이 희석만으로는 blood의 antibacterial activity를 충분히 저지하지는 못함을 뜻하는 것으로 생각된다.

SPS는 gram-positive bacteria의 증식에 탁월한 효과가 인정되고 있고, 항생제의 남용이 문제되고 있는 이때에 SPS가 Kanamycin sulfate, polymixin B, colistin sulfate, 및 gentamicin을 inactivate시킨다는 점⁷⁾, 그리고 SPS첨가에 의해서 단축되는 *Sal. typhi* 배양기간 0.8~0.9일은 대단히 중요하다는 것을 고려할때 SPS를 blood culture media에 첨가함은 권장할만한 방법이라고 하겠다.

결 론

Blood culture media에 첨가된 SPS의 *Sal. typhi* 증식에 필요한 배양기간에 대한 영향을 시험하기 위하여 1973년 9월 부터 1974년 9월 사이에 2460건의 blood culture를 하였으며 다음 성적을 얻었다.

1. SPS첨가 BHI에서의 *Sal. typhi* 증식에 필요한 배양기간은 평균 2.7일로서 SPS비첨가 배지에서의 3.5일 보다 0.8일이 단축되었다.

2. SPS첨가 FTM에서의 평균 배양기간은 2.9일이며 비첨가 배지에서의 3.8일 보다 0.9일이 단축되었다.

3. 동일 검사물을 SPS첨가 및 비첨가 배지에 접종

하고 두 배지에 모두 증식된 검사물의 배양기간을 비교하면 SPS 첨가 배지에서 더 빨리 증식함을 볼 수 있었고 평균배양기간도 첨가 배지에서는 2.3일이며 비첨가 배지에서의 3.2일 보다 0.9일이 단축되었다.

참 고 문 헌

- 1) Von Haebler, T. and Miles, A.A.: *The action of sodium polyanethol sulfonate ("Liquoid") in blood culture J. Path. & Bacteriol.*, 46, 245, 1938.
- 2) Ellner, P.D. and Stoessel, C.J.: *The role of temperature and anticoagulant on the in vitro survival of bacteria in blood. J. Inf. Dis.*, 116, 138, 1966.
- 3) Rosner, R.: *Effect of various anticoagulants and no anticoagulant on ability to isolate bacteria directly from parallel clinical blood specimens. Amer. J. Clin. Path.* 49, 216, 1968.
- 4) Evans, G.L. and Searcy, R.L.: *Comparative effect of anticoagulants on bacterial growth in experimental blood cultures. Am. J. Med. Tech.*, 34, 103, 1968.
- 5) Silver, H. and Sonnenwirth, A.: *A practical and efficacious method for obtaining significant post mortem blood cultures. Amer. J. Clin. Path.*, 52, 433, 1969.
- 6) Stokes, E.J.: *Clinical bacteriology, 3rd ed., Edward Arnold, London, 1972.*
- 7) Rosner, R.: *A quantitative evaluation of three blood culture systems. Amer. J. Clin. Path.*, 57, 220, 1972.
- 8) Holdeman, L.V. and Moore, W.E.C.: *Anaerobe laboratory manual, 2nd ed., VPI & SU, Blacksburg, 1973.*
- 9) Bailey, W.R. and Scott, E.G.: *Diagnostic microbiology. 2nd ed., Mosby, Saint Louis, 1966.*
- 10) Jacox, R.F.: *The activating effect of calcium on a bactericidal substance for Bacillus subtilis in human serum. J. Exp. Med.*: 92., 101, 1950.
- 11) Adler, F.L.: *Studies on the bactericidal reaction. I. Bactericidal action of normal sera against a strain of Salmonella typhosa, J. Immunol.*, 70, 69, 1953.
- 12) Skarnes, R.C. and Watson, D.W.: *Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. Bact. Rev.*, 21, 273, 1957.
- 13) Donaldson, D.M. and Marcus, S.: *Studies on serum bactericidal activity. Interrelationship of heparin, citrate, protamin and X-irradiation on serum and plasma bactericidal activity against Bacillus subtilis. J. Immunol.*, 81, 292, 1958.
- 14) Osawa, E. and Muschel, L.H.: *The bactericidal action of normal serum and the properdin system. J. Immunol.*, 84, 203, 1960.
- 15) Roantree, R.J. and Rantz, L.A.: *A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. J. Clin. Invest.*, 39, 72, 1960.
- 16) Hirsch, J.G.: *Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. J. Exp. Med.*, 112, 15, 1960.
- 17) Rowley, D.: *Antibacterial system of serum in relation to nonspecific immunity to infection. Bact. Rev.*, 24, 166, 1960.
- 18) Scott, E.G.: *A practical blood culture procedures. Amer. J. Clin. Path.*, 21, 290, 1951.
- 19) Garrod, P.R.: *The growth of Streptococcus viridans in sodium polyanethol sulfonate ("Liquoid") J. Path. and Bacteriol.*, 91, 621, 1966.
- 20) Rammell, C.G.: *Inhibition by citrate of the growth of coagulase-positive Staphylococci. J. Bacteriol.*, 84, 1123, 1962.