

Sodium Amylosulfate 의 *Salmonella typhi*

증식에 대한 영향

연세대학교 의과대학 임상병리과

정윤섭 · 김성옥 · 이삼열

= Abstract =

Effect of Sodium Amylosulfate on the Growth of *Salmonella typhi*

Yunsop Chong, Sung Ok Kim and Samuel Y. Lee

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine,
Seoul, Korea

Sodium amylosulfate (SAS) has been reported to be an effective substance to inactivate the antibacterial activity of blood in blood culture media. The advantage of the use of SAS over sodium polyanethol sulfonate (SPS) is that it does not inhibit the growth of some bacterial species which are known to be inhibited by SPS. As to *S. typhi*, SPS is reported to enhance the growth, however the effect of SAS on this organism is not known as yet.

Using 43 strains of *S. typhi*, isolated from clinical materials, the authors tried to determine the effect of SAS on this organism. The methods used for this study were: the SPS and SAS paper disk sensitivity test, tests on the growth in trypticase soy broth (TSB) with SPS and with SAS, and experimental blood culture in SPS and SAS incorporated TSB. The following results were obtained.

1). *S. typhi* strains with the turbidity of No. 0.5 tube of MacFarland nephrometer were inoculated onto Mueller-Hinton plate and 1 mg disk of SPS and SAS were applied. After 24-hour incubation, none of the 43 strains showed inhibition zone by SPS disk, but all of them showed zones by SAS disk with a mean zone diameter of 9.5 mm (Table 1).

2) Inocula consisting of one to 54 viable counts of 37 strains were inoculated into three different media; TSB with 0.05% SPS, TSB with 0.05% SAS and TSB alone. After 24-hour incubation the mean of the optical densities of each medium were 0.483, 0.482 and 0.459 respectively, showing that SAS does not inhibit the growth of *S. typhi*. Moreover it was shown that there was no correlation between the amount of inocula and growth (Table 2 and Fig. 1).

3). Each set of media in 5 ml amounts consisting of one tube of TSB with 0.05% SPS, one tube of TSB with 0.05% SAS and two tubes of TSB were inoculated with 8, 64, 640 and 6400 viable counts of bacteria. Then 0.5 ml of fresh normal blood was added to all tubes except for one tube of TSB.

Macroscopic observation after 24 hour incubation showed a heavy growth in all tubes except for the tube of TSB plus blood, which showed only a light growth in the tube of the heaviest inoculum. This result clearly demonstrates that the growth of *S. typhi* is inhibited by some antibacterial activities of

fresh blood, which are counter acted by SPS and SAS (Table 3). Between SPS and SAS, there was no significant difference found (Table 4 and Fig. 2).

With all these results it can be postulated that the addition of SAS into a routine blood culture media may raise the positivity of *S. typhi* isolation and shorten the incubation period.

서 론

혈액배양은 균혈증을 동반하는 세균성감염을 진단하는데 있어서 가장 중요한 검사법의 하나이다. 장티프스의 발생이 많은 우리나라에서는 그 진단을 위한 혈액배양이 전체 혈액배양중 가장 다수를 차지한다¹⁾. 따라서 다른 세균 뿐 아니라 장티프스균이 잘 배양되는 배지의 연구는 큰 과제의 하나이다.

균혈증 환자의 혈액에 들어 있는 세균은 더께 그 수가 많지 않으며^{2,3,4)}, 혈액은 beta-lysin, normal antibody complement system, lysozyme, WBC 등에 의한 antibacterial activity를 가지고 있으므로⁵⁻¹¹⁾, 이 작용을 억제 해야만 혈액배양 양성율이 높아지고 배양이 빨라지게 된다. 항균작용의 억제를 위하여는 sodium poly-anethol sulfonate (SPS)가 배지에 첨가되어 왔으며, 이것은 *S. typhi*를 포함한 여러 균종의 배양에 좋은 영향을 미치지만¹²⁻¹⁶⁾, 반대로 meningococcus와 *Peptostreptococcus anaerobius*의 증식이 억제되거나 *Peptococcus prevotii*와 *P. magnus*의 증식이 지연되는 일이 있음이 보고되어 있다^{17,18)}.

Sodium amylosulfate (SAS)는 감자의 amylopectin으로 부터 만든 sulfonated polysaccharide로서 혈액의 항응고작용이 있고 calcium의 약한 chelating agent이다. 이것은 SPS와 마찬가지로 혈액의 항균작용을 억제하며, SPS에 의해서는 증식이 억제되는 균종에 대해서도 억제작용이 없으므로 배지에 첨가되어 사용되기 시작하였으나¹⁹⁻²¹⁾, *S. typhi* 배양에 대한 영향은 보고된바 없는 것으로 알고 있다.

본 실험에서는 *S. typhi* 균주중 SAS에 감수성이 있는 균주가 있는지 screening하기 위하여 paper disk sensitivity test를 하였고, SAS의 증식에 대한 영향을 시험하기 위하여 broth에서 증식도를 비교하였고, SAS에 의한 혈액 항균작용의 억제를 시험하기 위하여 실험적 혈액배양을 실시하였으며 SPS의 영향과 아울러 비교하였다.

실험재료 및 방법

S. typhi 균주는 1975년 9월에서 1976년 2월 사이에

연세의료원 환자의 혈액(25주)과 변(18주)에서 분리한 것을 사용하였다. 실험균주를 혈액배양에서 분리할 때는 SPS나 SAS가 첨가 안된 배지를 사용하였다.

SPS는 ICN pharmaceutical INC., plainview, N.Y. 제품(Cat. No. 17770, Cont. No. 1691-A)를, SAS는 Searie diagnostic INC., Columbus, Ohio에서 공급한 것을 사용하였다.

1) Paper disk sensitivity

여과지(No. 2, chemically prepared; Toyo Roshi LTD., Japan)로 지름 7 mm의 disk를 만들고 멸균하였다. SPS와 SAS의 10% 수용액을 15 lbs에 15분간 멸균후 1 disk에 10 μ l를 투기어 1 mg이 포함되어 하였다.

시험세균을 trypticase soy broth(TSB, BBL)에 접종, 24시간 배양후에, saline을 써서 MacFarland No. 0.5 tube의 탁도로 희석하고, 이 부유액을 면봉으로 Müller-Hinton(Difco)평판에 도말후 disk를 놓고 35°C에 24시간 배양후에 억제대의 지름을 재었다.

2) SPS와 SAS첨가 TSB에서의 증식

TSB+SPS, TSB+SAS, 및 TSB의 세 배지를 OD가 같은 13×100 mm의 Pyrex 시험관에 4 ml씩 분주 멸균하였다. 배지중의 SPS나 SAS의 농도는 0.05%가 되게 하였다. 혈액에서 분리한 균주(No. 75-12-706)을 TSB에 24시간 배양후 saline으로 10배 단계희석하고, 각 부유액 0.05 ml씩을 위의 세 broth와 혈액한천평판에 접종하였다. 혈액한천에 접종한 것은 지름 3 cm로 컸다.

접종된 배지는 35°C에 24시간 배양하고, 혈액한천에 형성된 집락수를 세어 inoculum 중의 세균수(viable count)로 하였고, 가능한 한 세균이 적게들어 있는 inoculum이 접종된 TSB를 택해서 그 OD를 spectrophotometer(Spectronic 20, B & L)을 써서 660 nm에서 측정하였다.

3) 실험적 혈액배양에 있어서의 SPS와 SAS의 효과

SPS와 SAS는 0.05% 농도로 TSB에 첨가하였고, 첨가 안된 TSB를 대조배지로 하였다. 배지는 5 ml씩 16×125 mm 시험관에 분주하고 15 lbs에 15분간 멸균

하였다. 시험(2)의 균주를 시험(2)에서와 같이 배양, 회석하고 각 부유액 0.05 ml씩을 ① TSB+SPS, ② TSB+SAS, ③ TSB, ④ TSB 및 혈액한천평판에 접종하였다. 혈액한천평판은 시험(2)에서 같이 inoculum 중의 세균수 결정에 사용한다. WBC count 6100/mm³ 이고, Widal titer 가 1:20(시험편 회석회석)에서 응집 음성이며 근년에 장티프스 예방접종을 받은바 없는 건강인의 혈액을 제혈 즉시 용고되기 전에 0.5 ml씩 ①, ② 및 ③시험판에 넣었다. ④시험판은 혈액도, 항응고제도 없는 대조로 ③시험판은 항응고제 없는 대조로 하였다.

35°C에 배양후에 inoculum 중 세균수가 8, 64, 640, 6400인 시험판의 증식을 육안으로 관찰하여 SPS와 SAS의 첨가 효과를 비교하였다. SPS와 SAS의 효과를 비교하기 위하여는 세균이 8, 64, 640 접종된 시험판을 24시간 배양후에 blood broth mixture를 saline으로 단계회석한후 혈액한천에 접종, 세균수(viable count)로 하였다.

성 적

1) Paper disk sensitivity

시험된 *S. typhi* 43주중 SPS 1mg disk에 의해 억제대가 생겼지는 없었으나 SAS 1mg disk에 의해서는 모든 균주에서 억제대가 관찰되었고 그 지름은 9~11 mm(평균 9.5 mm)이었다(Table 1). 그 억제대는 disk에서 멀어질수록 차츰 heavy growth가 되는 것이 아니고 억제대 밖은 곧 heavy growth를 보였다.

Table 1. SPS and SAS sensitivity of *S. typhi* isolates by paper disk method

Inhibition zone (mm)	No. of strains	
	SPS	SAS
None	43	0
9	0	17
10	0	19
11	0	7
Total (Mean diameter)	43	43 (9.5 mm)

Table 2. Effect of SPS and SAS in TSB on the growth of *S. typhi*

No. of bacteria per inoculum*	OD x 1,000**		
	TSB+SPS	TSB+SAS	TSB
1 - 54	483	482	459

* Viable count.

** Mean of 37 isolates.

2) SPS와 SAS 첨가 TSB에서의 증식

접종된 세균수가 1~54인 TSB+SPS, TSB+SAS 그리고 TSB에서의 37주의 *S. typhi* 증식에 의한 탁도(OD×1,000)의 평균은 각각 483, 482, 및 459 이었다(Table 2, Fig. 1). 접종 세균수가 적었던(1/inoculum) 시험균주에 있어서나 많았던(54/inoculum) 것에 있어서나 24시간 배양후의 OD는 비슷하였다.

Table 3. Effect of SPS and SAS on the growth of *S. typhi* in experimental blood culture

Media	Incubation time	Inoculum*			
		6.4×10 ⁹	6.4×10 ²	6.4×10 ¹	8×10 ⁰
TSB+SPS+Blood	24 hr	++++**	++++	+++	++
	48 hr	++++	++++	++++	++++
TSB+SAS+Blood	24 hr	++++	+++	++	++
	48 hr	++++	++++	++++	++++
TSB+Blood	24 hr	+	-	-	-
	48 hr	++++	-	-	-
	7 day	++++	-	-	-
TSB	24 hr	++++	++++	++++	++++

* Viable count per inoculum. ** +++++, very heavy growth; +++, heavy growth; ++, moderate growth; +, light growth; -, no growth.

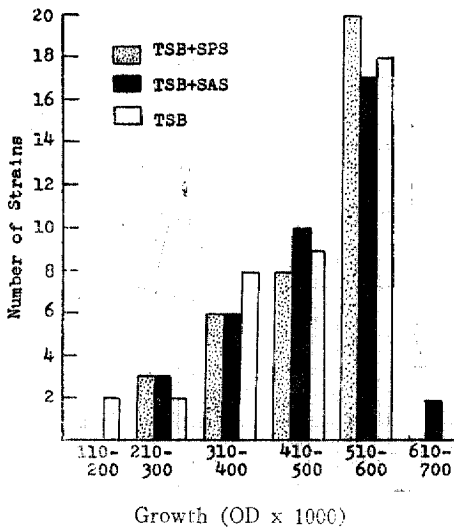


Fig. 1. Comparison of the growth in TSB with SPS, TSB with SAS, and TSB of 37 isolates of *S. typhi* after 24-hour incubation.

3) 실험적 혈액배양에 있어서의 SPS와 SAS의 효과

접종세균수가 8, 64, 640, 6400인 4종류의 배지에서 세균증식을 24시간 배양후 육안으로 비교한바(Table 3), 혈액도 항응고제도 안 들은 대조 TBS에서는 접종 세균수 8인 시험관에도 very heavy growth를 보인 반면, 항응고제 없이 혈액이 가해진 대조배지에는 접종 세균수 6400인 것에만 light growth를 보였다. TSB+SPS와 TSB+SAS에서는 접종세균수가 8인 것에도 moderate growth를 보였다.

48시간 배양후에 TSB+SPS와 TSB+SAS 전부에

Table 4. Comparison of effect of SPS and SAS on the growth of *S. typhi* in experimental blood culture determined after 24-hour incubation

No. of bacteria per inoculum	Growth*		
	640	64	8
TSB+SPS+blood	4.2×10^8	1.6×10^8	5.6×10^7
TSB+SAS+blood	1.2×10^8	1.5×10^7	3.0×10^7

* Number of bacteria per ml of blood broth mixture determined by viable count.

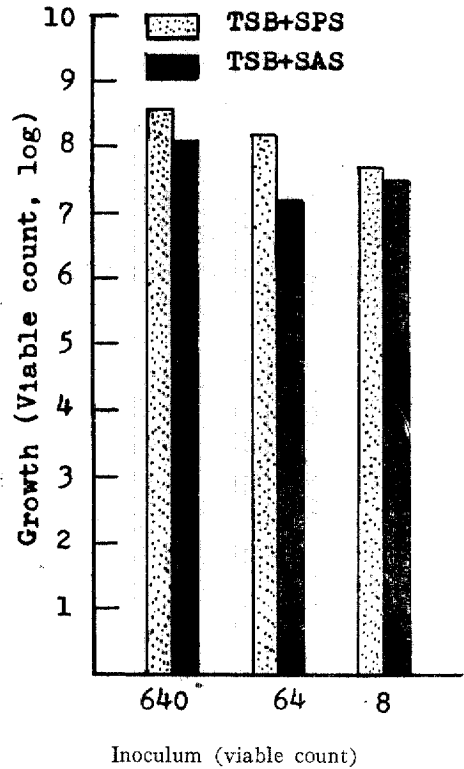


Fig. 2. Comparison of the effect of SPS and SAS on the growth of *S. typhi* in the experimental blood cultures after 24-hour incubation.

very heavy growth를 보였으나 대조 TSB에는 접종 세균수 6400인 시험관에서 증식이 very heavy growth로 진행되었고 8, 64, 640인 시험관에서는 7일간 배양후에도 증식이 관찰되지 않았고 blood broth mixture 0.05 ml의 subculture에 의해서도 세균을 증명할수 없었다.

접종세균수가 8, 64, 640인 시험관의 24시간 배양후의 세균수는 TSB+SPS에서는 $5.6 \times 10^7 \sim 4.2 \times 10^8$ /ml, TSB+SAS에서는 $1.5 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$ /ml이었다. 접종세균수가 8인 시험관과 640인 시험관의 증식도의 차는 크지 않았다(Table 4, Fig. 2).

고 안

Paper disk sensitivity test는 SPS에 의해 증식이 억제되는 균주를 쉽게 screening하기 위하여 고안되었다¹³⁾. 본 실험에서 시험된 43주의 *S. typhi*중 SPS lmg disk에 의해 억제대가 형성된 균주는 없었으며(Table

1) 이 결과는 0.05% SPS 첨가 액체배지에서 증식이 억제되는 균주가 없을 것임을 나타내는 것으로 생각된다.

한편 SAS 1 mg disk에 의해서는 시험균주 모두에서 평균 9.5 mm의 억제대가 형성되었다. 이 억제대는 SPS 감수성인 *Ps. anaerobius*가 보인 12~14mm¹⁷⁾, meningococcus의 10~20 mm¹⁸⁾ 보다는 너무 작아서 감수성으로 판독해야 될지는 의문이다. 대조로 쓴 gonococcus의 SPS 억제대는 disk에서 멀어짐에 따라 차츰 heavy growth를 보였으나 *S. typhi*의 SAS 억제대는 그 밖이 곧 heavy growth로 이행되었다. 이 현상은 SAS는 SPS와는 달리 그 10% 수용액의 점조성이 높아서 배지로의 확산이 느리어 disk 주변의 농도가 높기 때문인 것으로 추측된다.

TSB+SPS, TSB+SAS에서의 *S. typhi* 37주의 증식에 의한 OD의 평균은 거의 같았고(Table 2, Fig. 1) 항응고제가 안된 TSB의 OD와도 비슷하여 SAS는 SPS와 마찬가지로 이 세균의 증식을 전연 억제하지 않는 것으로 생각된다. 점중세균수는 균주에 따라 1~54로 차가 컸으나 그 OD는 비슷하였는데 이것은 SPS나 SAS가 세균이 소수점종된 경우에도 억제작용을 하지 않기 때문인 것으로 생각된다.

실험적 혈액배양에서(Table 3), 혈액첨가 TSB에서는 점중세균수가 640인 시험관에서 7일 후까지 증식이 안된 반면 혈액첨가 없는 TSB에서는 점중세균이 8뿐인 시험관에도 24시간 후에 very heavy growth를 보여 혈액의 *S. typhi*에 대한 항균 작용을 분명히 나타내었다. TSB+SPS나 TSB+SAS에서는 점중세균수 8인 시험관에도 24시간 후에 moderate growth를 보여 SPS나 SAS이 갖는 혈액항균작용의 억제효과를 뚜렷이 보였다. 이것은 실험적 혈액배양에 있어서 이 화합물들의 첨가 없이는 10⁴/ml의 세균이 있어야 증식된다는 보고¹⁹⁾와 비슷한 결과를 *S. typhi*에 있어서도 나타낸 것이다. 점중세균수가 8, 64, 640인 TSB+SPS와 TSB+SAS의 24시간 배양후의 세균수는 비슷하여 SPS나 SAS의 우열을 가릴수 없었다(Table 4).

이 실험결과를 종합해 볼때 SAS 0.05% 첨가 TSB를 clinical blood culture에 사용하면 SPS 첨가의 경우와 같이 *S. typhi* 배양에 좋은 결과를 얻을 것으로 생각된다.

결 론

S. typhi 증식에 대한 SAS의 영향을 규명하기 위하여 SPS와 SAS paper disk sensitivity, SPS와 SAS

첨가 TSB에서의 증식 비교, 실험적 혈액배양에서 SPS와 SAS의 혈액 항균작용 억제력을 시험하여 다음 결론을 얻었다.

1) *S. typhi* 균주중 SPS disk에 감수성인 것은 없었다. SAS disk에 의해서는 시험균주 모두가 평균 9.5 mm의 작은 억제대를 보였다.

2) SPS와 SAS 첨가 TSB와 대조 TSB에서의 *S. typhi* 증식에 의한 OD의 평균은 비슷하였다. 점중세균수가 적은 경우에도 어느 배지이나 heavy growth를 보였다.

3) 실험적 혈액배양에서 *S. typhi*에 대한 혈액의 항균작용과, SPS와 SAS의 항균작용 억제력을 증명할 수 있었다. SAS의 효과는 SPS의 효과와 비슷하였다.

SAS disk sensitivity를 *S. typhi* 감수성 균주의 screening test로 쓰기 위하여는 그 시험방법과 판독기준의 검토가 필요한 것으로 생각되었다. SAS 0.05% 첨가 TSB를 clinical blood culture에 쓰면 *S. typhi*의 배양 양성율을 높이고 양성시기를 앞당길수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Chong, Y. and Kim, H.S., *Results of blood cultures done over a 5 year period at Yonsei Medical Center Kor. J. Pathol.* 9:71, 1975.
- 2) Werner, A.S., Cobbs, C.G., Kaye, D. and Hook, E.W.: *Studies on the bacteremia of bacterial endocarditis. J. Amer. Med. Assoc.* 202: 127, 1967.
- 3) Sullivan, N.M., Sutter, V.L., Carter, W.T., Attebery, H.R., and Finegold, S.M.: *Bacteremia after genitourinary tract manipulation: Bacteriological aspects and evaluation of various blood culture systems. Appl. Microbiol.* 23: 1101, 1972.
- 4) Dietzman, D.E., Fisher, G.W., and Schoenknecht F.D.: *Neonatal Escherichia coli septicemia -bacterial counts in blood. J. Pediatr.* 85: 128, 1974.
- 5) Adler, F.L.: *Studies on the bactericidal reaction. I. Bactericidal action of normal sera against a strain of S. typhosa. J. Immunol.* 70:69. 1953.
- 6) Skarnes, R.C. and Watson, D.W.: *Antimicrobial*

- factors of normal tissues and fluids. Bact. Rev.*, **21**:273, 1957.
- 7) 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.
 - 8) Hirsch, J. G.: *Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. J. Exp. Ed.*, **112**:15, 1960.
 - 9) Osawa, E. and Muschel, L.H.: *The bactericidal action of normal serum and the properdin system. J. Immunol.*, **84**:203, 1960.
 - 10) 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.
 - 11) Rowley, D.: *Antibacterial system of serum in relation to nonspecific immunity to infection. Bact. Rev.*, **24**:166, 1960.
 - 12) Rosner, R.: *Effect of various anticoagulants and no anticoagulant on ability to isolate bacteria directly from parallel clinical blood specimens. Amer. J. Clin. Pathol.*, **49**:216, 1968.
 - 13) Kocka, F.E., Magoc, T. and Searcy, R.L.: *Action of sulfonated polyanions used in blood culture. Ann. Clin. Lab. Sci.*, **2**:470, 1972.
 - 14) Rosner, R.: *A quantitative evaluation of three blood culture systems. Amer. J. Clin. pathol.*, **57**:220, 1972.
 - 15) Bartlett, R.C., Ellner, P.D. and Washington II, J. A.: *Cumitech 1: Blood culture. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.*, 1974.
 - 16) Chong, Y.: *Effect of sodium polyanethol sulfonate on the isolation of Salmonella typhi from blood culture. J. Kor. Soc. Microbiol.*, **9**:13, 1974.
 - 17) Graves, M.H., Morello, J.A. and Kocka, F.E.: *Sodium polyanethol sulfonate sensitivity of anaerobic cocci. Appl. Microbiol.*, **27**:1131, 1974.
 - 18) Eng, J. and Iveland, H.: *Inhibitory effect in vitro of sodium polyanethol sulfonate on the growth of Neisseria meningitidis. J. Clin. Microbiol.*, **1**:444, 1975.
 - 19) Kocka, F. E., Magoc, T. and Searcy, R.L.: *New anticoagulant for combating antibacterial activity of human blood. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **140**:1231, 1972.
 - 20) Kocka, E.E., Arthur, E.J., Searcy, R.L., Smith, M. and Grodner, B: *Clinical evaluation of sodium amylosulfate in human blood cultures. Appl. Microbiol.* **26**:421, 1973.
 - 21) Kocka, F.E., Arthur, E.J. and Searcy, R.L.: *Comparative effects of two sulfated polyanions used in blood culture on anaerobic cocci. Amer. J. Clin. Pathol.* **61**:25, 1974.