

자동배양기를 이용한 미생물 검출

성혜란 · 김일희 · 김지연 · 이종길 · 정연복 · 한상배 · 송석길*

충북대학교 약학대학 약동력학 국가지정연구실, 충북 BIT 연구중심대학 육성사업단

미생물 자동배양기를 이용한 감염성 물질의 검출은 시험적 오차의 경감은 물론 분리율 향상과 시간 단축을 가능하게 하였다. BacT/ALERT 3D 자동배양기는 미생물 성장 시 발생하는 이산화탄소를 비색법으로 검출하는 장비로서 임상시료를 이용한 미생물 배양과 검출에 이용되어왔다. 자동배양기의 효율성을 검증하고 의약품의 무균 시험에 적용 가능한지를 평가하기 위하여 6종의 세균을 이용하여 증식 및 검출특성을 분석하였다. 3종의 호기성 세균 *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*는 1 CFU가 31.44시간 내에 검출되었고, 혐기성균인 *Clostridium sporogenes*는 15.96시간에 균의 증식이 감지되었다. 저성장 혐기성세균인 *Propionibacterium acnes*는 10⁴ CFU의 균수에서 검출에 129.36 시간이 소요되었다. 이 같은 결과는 전통적 직접 배양법보다 검출감도에 있어서 10⁻¹⁰배 높고, 검출시간을 2-10시간 단축한 것으로서 자동배양법이 미생물 증식과 검출에 효율적임을 말해준다. 따라서 본시험에서 이용한 자동배양법은 임상시료에서의 감염원 진단뿐 아니라 생물의약품의 무균시험에 이용 가능하다고 판단된다.

Key words □ automated culture system, BacT/ALERT, sterility

혈액이나 감염조직으로부터 감염원을 검출하기 위하여 약 30년 전부터 BACTEC 460 (Becton Dickinson, USA)을 비롯하여 자동배양 시스템이 개발되어 왔다. 이러한 자동배양기의 기본원리는 미생물 증식에 의해 생성되는 CO₂로 인해 생기는 pH의 변화, 산화환원전위 변화 등을 감지하고 분석하여 미생물의 증식여부를 판단하는 것이다(1, 8). 가장 먼저 도입된 BACTEC 460 (Becton Dickinson, USA)은 방사성 탄소의 분석 분석방식으로 방사능 배지의 취급이나 폐기에 주의가 필요하므로 이후 비방사성 분석방식의 BACTEC 660/730/860 (Becton Dickinson, USA), BioArgos (Diagnostics Pasteur, France) 등이 개발되었지만, 이들은 자동배양은 가능할지라도 연속적인 검출이 불가능하여 위양성 결과가 나타나기 쉬운 단점이 있었다(2, 8, 16). 이러한 단점을 보완하여 연속 모니터링이 가능한 색변화 검출방식의 BacT/ALERT (bioMerieux, Inc., USA), 형광검출방식의 Vital (bioMerieux vitek, France), BACTEC 9240 (Becton Dickinson, USA), 압력측정방식의 ESP (Difco, USA), o.a.s.i.s (Oxoid Automated Septicaemia Investigation System Unipath, United Kingdom) 등의 여러 배양기들이 개발되었다(3, 6, 7, 9, 13, 17).

BacT/ALERT 3D 자동배양기(bioMerieux, Inc., USA)는 연속모니터링이 가능한 최초의 자동배양기인 BacT/ALERT의 최근 모델로 미생물의 증식에 따라 CO₂양이 증가하면 배양액의 pH가 변화하고 배양용기 바닥에 부착된 LED 발광센서의 색깔이 청색(음성)에서 황색(양성)으로 변한다. 이러한 변화는 매10분마다 자

동으로 탐지자에 의해 감지되어 전극 신호로 변환되고 이는 컴퓨터에서 자동으로 분석함으로써 효과적으로 미생물을 검출하는 시스템이다(5, 6, 13, 16). 최근 생물의약품의 미생물학적 안전성을 확보하고자 미국 FDA에서는 선진화된 자동배양 시스템을 도입하여 생물의약품에 적합한 대체무균시험법으로 공인하였으며, 종합병원의 임상병리실 등에서도 전통적인 맹계대(blind subculture) 혈액 배양법을 자동화된 배양시스템으로 대체함으로써 노력과 비용을 절감하고 신속하고 효과적인 진단을 하고 있다(3, 4, 10, 11, 12).

혈액제제 및 생물의약품에서 오염, 전파 가능한 미생물 오염원 중 무균시험법의 표준균주를 포함한 3종의 호기성 세균(*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), 1종의 통성혐기성균(*Staphylococcus aureus*) 및 2종의 혐기성 세균(*Clostridium sporogenes*, *Propionibacterium acnes*)을 대상으로 BacT/ALERT 3D 자동배양기의 검출감도와 유용성을 평가하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양용 시료의 제조

American Type Culture Collection (ATCC) 또는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에서 구입한 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 2513), *Bacillus subtilis* (KCTC 1021), *Micrococcus luteus* (KCTC 1071), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1927), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Propionibacterium acnes* (ATCC 33179) 6종의 미생물 균주를 이용하였다. 먼저 자동배양기를 이용한 시험에 사용하기 위한 표준배양균액을 준비하기 위해 각각의 미생

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2817, Fax: 82-43-268-2732
E-mail: songs@chungbuk.ac.kr

물마다 적합한 배지에 접종하여 포화될 때까지 충분히 배양하였다. *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *S. aureus* 3종의 미생물은 thioglycollate 배지에(Sigma, USA 또는 Merck, USA) 접종하였고, *B. subtilis*는 tryptic soy broth (BD, USA) 배지에, 혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*와 *C. sporogenes*는 각각 potato dextrose 배지와 reinforced clostridial medium (Merck, USA) 배지에 접종하여 배양하였다. 배양한 균액에 20%의 glycerol을 첨가하고 이를 0.2 ml씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

BacT/ALERT 3D 자동배양

준비된 배양용 시료는 자동배양용 호기성 표준배지(SA media; 1.7% of pancreatic digest of casein, 0.3% of papaic digest of soybean meal, 0.035% of sodium polyanetholesulfonate, 0.001% of pyridoxine HCl) 또는 혐기성 표준배지(SN media; 1.36% of pancreatic digest of casein, 0.24% of papaic digest of soybean meal, 0.035% of sodium polyanetholesulfonate, 0.00005% of menadione, 0.0005% of hemin, 0.376% of yeast extract, 0.0008% of pyridoxine HCl, 0.08% of pyruvic acid sodium salt)에 접종하여 BacT/ALERT 3D 자동배양 장비에서 5일간 배양하였다. 호기성 표준배지(SA)와 혐기성 표준배지(SN) 모두 배지의 성분은 일반적으로 다양한 미생물의 배양에 널리 이용되는 tryptic soy broth가 주성분이며 혈액샘플의 배양이 용이하도록 하는 sodium polyanetholesulfonate 항응고제가 첨가되어 있다. 혐기성 표준배지(SN)는 난배양성 미생물들의 성장을 돕는 Hemin, Vitamin K, Pyridoxine 등이 추가되어 있다.

매 시험시마다 초저온냉동고에 보관된 표준배양균액을 꺼내 각각의 배지에 duplicate로 접종하고 적합한 배양온도 및 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 이를 10배 계열희석한 후 일회용 주사기를 이용하여 5 ml씩 호기성 표준배지(SA) 또는 혐기성 표준배지(SN)에 접종하고 BacT/ALERT 3D 자동배양기에서 5일간 배양하였다.

생균수의 측정

BacT/ALERT 3D 자동배양에 접종된 검체의 균수를 확인하기 위하여 가장 보편적으로 사용되는 평판계수법을 이용하여 생균수를 측정하였다. 각 배양검체 250 µl를 평판 고체배지에 골고루 도말하고 항온기에서 2일 이상 배양한 후 생성된 집락의 수를 헤아려 생균수를 측정하였다. 평판고체배지에서 형성된 집락의 수는 검체 내에 포함되어 있는 집락형성이 가능한 살아있는 세균의 숫자(CFU; colony forming unit)를 의미한다. 자동배양기를 이용한 세균 검출 시험에서 실제로 각 배양 병에 접종된 검체의 양은 5 ml이므로 헤아린 집락 수에 20배를 곱하고, 접종한 균액의 희석 배율을 곱해 실제 검체에 존재하는 초기 세균수를 구하였다.

직접배양법에 의한 세대시간 측정

자동배양기를 이용한 검출방법과 직접배양법에 의한 미생물의 검출을 비교할 수 있는 객관적 지표를 설정하기 위하여 직접배

양시 각 미생물의 세대시간(generation time)을 구함으로써 검출감과 검출한계를 측정하고자 하였다. 배양하는 동안 혐기적 조건에서 수시로 배양액을 채취하는 것이 불가능한 혐기성균을 제외하고 *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *S. aureus* 3종의 미생물은 thioglycollate (FTM) 배지, *B. subtilis*는 tryptic soy broth (TSB) 배지에 접종하여 37°C에서 배양하면서 매 30분마다 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 바탕으로 증식이 활발히 이루어지는 지수기(exponential phase)의 초기균수(A)와 말기균수(B)를 구하고 이 두 시점 사이의 시간(T) 값을 $Tg = T \times \log_2(1/\log B - 1/\log A)$ 공식에 대입, 계산하여 각 미생물의 증식 세대시간(Tg)을 구하였다 (Table 2).

그람 염색 및 현미경 관찰

BacT/ALERT 3D 자동배양기에 의한 미생물의 검출 결과가 신뢰성 있는 결과인지 확인하기 위하여 양성으로 판정된 각각의 배양 병으로부터 균을 일부 채취하여 그람 염색법에 의해 염색하고 현미경(Leica RXA2, Germany)으로 균의 모양을 관찰함으로써 검출된 균을 확인하였다.

결과 및 고찰

임상시료나 생물의약품에서의 미생물 검출은 전통적으로 직접 배양법에 의존해 왔다. 그러나 직접배양법은 시험자의 조작에 따른 개인 편차가 크고 긴 시간이 요구되므로 무균시험이나 미생물 검출법이 다양한 생물학적 원리를 응용하여 개선되어 왔다. 최근에는 분자생물학적 기법이 적용된 핵산 분석법(NAT; nucleic acid technology), 중합효소연쇄반응(PCR; polymerase chain reaction) 등을 이용한 검출법이 적용되어 왔다(7). 그러나 이들 기법은 단일 대상미생물 유전자의 특정 염기서열을 검출하는 기법이므로 다양한 미생물을 단일 시험으로 검출하기 어려운 단점을 지닌다. 따라서 검출대상의 다양성 때문에 최근에 직접배양법에 의한 미생물 검출이 주목 받고 있다. 하지만 직접배양법 역시 배양이 까다로운 미생물의 검출이 어렵고 노력과 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다(1, 3, 8). 따라서 이러한 단점을 보완하고 미지의 다양한 오염원을 자동으로 배양 가능하며 미생물의 성장을 연속적으로 검출할 수 있는 자동배양기가 이용되어 오고 있다. 자동배양기는 이미 초기 스크리닝 단계로 임상시료 분석, 백신의 무균시험, 식품분야 및 혈액제제의 미생물 검출 및 무균시험법으로 이용되고 있다(6, 14, 15). 그러므로 3종의 호기성 세균(*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), 1종의 통성혐기성균(*Staphylococcus aureus*), 2종의 혐기성 세균(*Clostridium sporogenes*, *Propionibacterium acnes*)을 대상으로 직접배양법에 따른 미생물 검출법과 호기성 표준배지(SA) 및 혐기성 표준배지(SN)를 사용한 BacT/ALERT 3D 자동배양기를 이용한 미생물 검출법의 효율성 및 검출감도를 비교 평가하고자 하였다.

각 미생물의 표준 배양균액을 재배양하여 호기성 또는 통성혐기성균은 약 0.01 CFU부터 약 1,000 CFU까지 계열희석하였고 혐기성균은 약 0.01 CFU부터 약 1,000,000 CFU까지 계열희석

하였다. 이를 자동배양용 호기성 표준배지(SA) 및 혐기성 표준배지(SN)에 각각 반복배수로 접종하고 BacT/ALERT 3D 자동배양에서 5일간 배양하여 검출감도를 확인하였다. 직접배양 시 배양조건이 까다로운 혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*와 *C. sporogenes*은 5일 이상 배양, 관찰하였다. 자동배양기를 이용한 시험 결과, 통성혐기성균인 *S. aureus*와 호기성균인 *B. subtilis*는 호기성 표준배지(SA)와 혐기성 표준배지(SN)에서 모두 약 1 CFU까지 검출 가능하였다. *S. aureus*는 호기성 표준배지(SA)에서 18

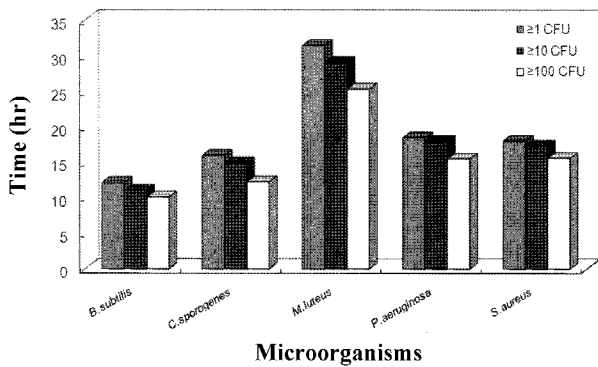
시간, 혐기성 표준배지(SN)에서는 21.84시간 후에 검출되었으며, *B. subtilis*는 호기성 표준배지(SA)에서 12.32시간, 혐기성 배지(SN)에서는 18.36시간 후에 검출되었다. 그러나 *P. aeruginosa*와 *M. luteus*는 혐기성 표준배지(SN)에서는 전혀 검출되지 않았고, 호기성 표준배지(SA)에서 각각 약 1 CFU까지 18.48시간, 31.44시간 후에 검출되었다. 혐기성세균인 *Propionibacterium acnes*와 *C. sporogenes*은 모두 호기성 표준배지(SA)에서는 전혀 검출되지 않았고 혐기성 표준배지(SN)에서 *C. sporogenes*는 약 1 CFU까지 15.96시간 후에 검출되었다. 직접 배양시 배양조건이 매우 까다로운 *Propionibacterium acnes*는 129.36시간 후에 약 10,000 CFU 이상에서 검출되었다(Table 1 and Fig. 1). 직접배양법의 미생물 검출감도와 비교하기 위하여 자동배양기를 이용한 미생물 검출법의 검출감도를 다음의 방법에 따라 환산하여 직접배양법과 비교하였다. 각 미생물의 최초접종균수와 세대시간(Tg), 그리고 약 1 CFU로 접종한 미생물이 BacT/ALERT 3D 자동배양기의 호기성 표준배지(SA bottle)에서 양성으로 판정되는 때까지 걸린 시간(Tb)을 이용한 $Pb = 2^{(Tb/Tg)}$ 공식에 근거하여 양성판정시점의 실제 균수(Pb)를 구하였다(Table 3). 이 때, 각 미생물의 세대시간(Tg)은 Table 2를 참고하였다. 이 결과, BacT/ALERT 3D 자동배양기를 이용한 미생물을 검출법으로 *B. subtilis*는 2.98×10^3 개의 균을 12.12시간에 검출할 수 있었고, *S. aureus*는 18시간 내에 1.05×10^6 개의 균을, *P. aeruginosa*는 18.48시간 내에 1.52×10^6 개의 균을 검출하였다. 또한, *M. luteus*는 7.71×10^7 개의 균을 31.44시간 내에 검출가능 하였다.

전통적으로 미생물 검출에 이용되어온 직접배양법은 육안으로 배양액의 탁도를 관찰하여 미생물의 검출여부를 판정하는 것이 일반적이다. 보통 배양액의 탁도를 육안으로 보아 미생물의 증식

Table 1. Growth detection of 6 microorganisms in both aerobic (SA bottle) and anaerobic (SN bottle) culture conditions

Microorganism	Growth condition	SA	SN
<i>B. subtilis</i>	Aerobic	○	○
<i>C. sporogenes</i>	Anaerobic	×	○
<i>M. luteus</i>	Aerobic	○	×
<i>P. acnes</i>	Anaerobic	×	○
<i>P. aeruginosa</i>	Aerobic	○	×
<i>S. aureus</i>	Facultative	○	○

* ○ ; detected, × ; not detected



Microorganism	Detection time (hr)		
	≥100 CFU	≥10 CFU	≥1 CFU
<i>Bacillus subtilis</i>	10.08	11.04	12.12
<i>Clostridium sporogenes</i>	12.24	14.88	15.96
<i>Micrococcus luteus</i>	25.32	29.04	31.44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.48	18.00	18.48
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.60	17.28	18.00

Fig. 1. Detection time of 5 microorganisms in BacT/ALERT 3D automated culture system at 37°C under aerobic (SA) or anaerobic (SN) bottles. The indicated number of cells from subculture of *B. subtilis*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* were inoculated in standard aerobic (SA) bottles and cultured until flagged as positive or for 5 days. The anaerobic bacteria *C. sporogenes* was inoculated in standard anaerobic (SN) bottles and cultured until flagged as positive or for 7 days. 1 CFU, inoculated about 1 cell; 10 CFU, inoculated about 10 cells 100 CFU, inoculated about 100 cells.

Table 2. Generation time and viable cell numbers per OD₆₀₀

Microorganism	Generation time (min)	Viable cell numbers (cells/OD ₆₀₀ ·ml)
<i>B. subtilis</i>	63	1×10^9
<i>M. luteus</i>	72	1×10^9
<i>P. aeruginosa</i>	54	1×10^{10}
<i>S. aureus</i>	54	1×10^{10}

Table 3. Detection sensitivity of 4 bacteria cultured by conventional culture method and BacT/ALERT 3D automated culture system

Microorganism	Conventional culture method		BacT/ALERT 3D system	
	Tc (hr)	Pc	Tb (hr)	Pb
<i>B. subtilis</i>	21.5	5×10^8	12.12	2.98×10^3
<i>M. luteus</i>	22.8	5×10^8	31.44	7.71×10^7
<i>P. aeruginosa</i>	20.9	5×10^9	18.48	1.52×10^6
<i>S. aureus</i>	22.8	5×10^9	18.00	1.05×10^6

* Tc; Time to reach at 0.5 OD₆₀₀; Pc; Probable number of cells at time, Tc, Tb; time to automatic detection, Pb; Probable number of cells at time Tb

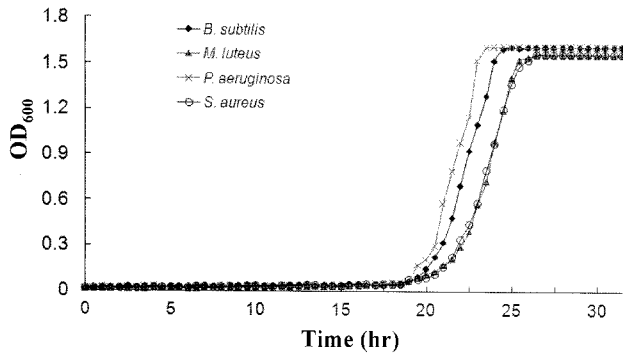


Fig. 2. Growth curves of 4 microorganisms under aerobic conditions. Microorganisms was inoculated about less than 0.1 of optical density at 600 nm and cultured with rapid shaking. At every 30 min, the 1 ml samples of culture were taken and measured the optical density by spectrophotometer at 600 nm wavelength. And the results were plotted the optical density (OD_{600}) vs. time (hr). *B. subtilis* and *M. luteus* was cultured in tryptic soy broth and thioglycollate media at 30, respectively. *P. aeruginosa* and *S. aureus* were cultured in thioglycollate media at 37°C.

이 확인되는 시점의 흡광도가 대략 $OD_{600}=0.5$ 정도이므로 이 시점을 양성으로 판정되는 시점으로 결정하였다. 이를 근거로 직접배양법에 의한 미생물 검출법의 검출감도를 다음과 같이 구하였다. 흡광도 측정이 불가능한 혐기성 미생물을 제외한 4종의 미생물을 각 미생물의 최적 배양 조건에서 $OD_{600}=0.1$ 이하(약 1 CFU 접종 시와 같은 조건)로 접종한 후 배양하면서 매 30분마다 600 nm 파장에서 흡광도 값을 측정하여 각 미생물의 성장곡선을 나타내었다(Fig. 2). 성장곡선을 토대로 각 미생물의 세대시간(Tg) 및 $OD_{600}=1$ 당 세균수, 그리고 $OD_{600}=0.5$ 가 되기까지 걸리는 시간 즉, 직접배양법에 의해 양성으로 판정되는데 걸리는 시간(Tc)을 구하였다. 또한 직접배양법에 의해 양성으로 판정되는 시점($OD_{600}=0.5$)의 실제 균수(P_c)는 각 미생물의 $OD_{600}=1$ 당 세균수(cells/ $OD_{600}=1$)를 이용해서 구하였다(Table 2 and 3). 직접배양법으로 배양한 결과 *S. aureus*와 *M. luteus*는 배양 22.8 시간 후에 양성으로 판별되었으며 이 시점의 실제 균수는 각각 약 5×10^9 , 약 5×10^8 정도였다. *P. aeruginosa* 역시 같은 조건에서 약 5×10^9 정도 증식하였을 때 양성으로 판별되었으며, 양성으로 판정되기까지는 20.9시간이 걸렸다. *B. subtilis*는 배양 후 21.5시간이 지나서 양성으로 판별되었고, 이때의 실제 균수는 약 5×10^8 정도였다(Table 3).

미생물의 특성상 직접배양법에 의한 미생물의 검출감도 측정이 불가능한 혐기성 미생물을 제외한 4종의 미생물에 대하여 호기성 표준배지(SA)를 사용하는 BacT/ALERT 3D 자동배양기에 의해 양성으로 판정될 때까지 걸리는 시간 및 검출감도를 직접배양법과 비교한 결과, 자동배양기를 이용한 검출법이 직접배양법보다 약 10~10만 배 더 검출감도가 높았으며 검출시간도 약 2~12시간 정도 단축하였다(Table 3). 그러므로 자동배양기에 의한 검출법이 적어도 호기성 미생물의 검출에 있어서는 직접배양법에 비해 훨씬 더 감도가 높은 효율적인 방법이라고 판단된다.

또한, 혐기성 균에 대해서도 검출시간이 직접배양 시와 거의 유사하거나 단축되는 결과를 관찰하였다. 호기성 세균이 자동배양기에서 검출되는 시점에서의 OD_{600} 값은 육안으로 관찰이 용이하지 않은 0.1 이하였으므로 자동배양기의 검출능은 감지시스템의 우수성에서 기인한다고 판단된다. 또한, 세포배양액에 spiking하여 일정량의 미생물에 대한 검출감도를 비교하여 세포배양액이 미치는 영향을 검토한 결과, 세포배양액에 항생물질이 포함되어 있지 않는 한 미생물 검출에 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 그러므로 혈액제제 뿐만 아니라 세포배양으로 제조되는 각종 생물의약품에 대한 미생물 검출법으로도 적용 가능함을 확인하였다.

감사의 말

We appreciate the technical support of Moo-Jin Kim for operation of BacT/ALERT 3D (bioMerieux Korea Inc). 이 논문은 2006년 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었음(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2006.).

참고문헌

- Alfa, M., W. Sanche, S. Roman, Y. Fiola, P. Lenton, and G. Harding. 1995. Continuous quality improvement for introduction of automated blood culture instrument. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1185-1191.
- Courcol, T.J., M. Duhamel, A. Decoster, V.M. LeMaire, M.L. Rastorgoueff, D. Ochin, and G.R. Martin. 1992. BioArgos: a fully automated blood culture system. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1995-1998.
- Gimenez, M., C. Part, X. Valles, and L. Matas. 2002. Evaluation of the VITAL (bioMerieux) automatic blood culture system using blind subcultures. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 222-228.
- Hardy, D.J., B.B. Hulbert, and P.C. Migneault. 1992. Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7 day negative cultures. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2743-2745.
- Kocoglu, M.E., A. Bayram, and I. Balci. 2005. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. *J. Microbiol.* 43, 257-259.
- Mirrett, S., K.E. Hanson, and L.B. Reller. 2007. Controlled clinical comparison of VersaTREK and BacT/ALERT blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 45, 299-302.
- Qian, Q., Y.W. Tang, C.P. Kolbert, C.A. Torgerson, J.G. Hughes, E.A. Vetter, W.S. Harmsen, S.O. Montgomery, F.R. Cockerill, 3rd., and D.H. Persing. 2001. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3578-3582.
- Reimer, L.G., M.L. Wilson, and M.P. Weinstein. 1997. Update on detection of Bacteremia and Fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 444-465.
- Rohner, P., B. Pepey, and R. Auckenthaler. 1995. Comparison of BacT/Alert with signal blood culture system. *J. Clin. Microbiol.*

- 33, 313-317.
10. Saito, T., K. Senda, S. Takakura, N. Fugihara, T. Kudo, and Y. Inuma. 2003. Detection of bacteria and fungi in BacT/ALERT standard blood culture bottles. *J. Infect. Chemother.* 9, 227-232.
 11. Snyder, J.W., G.K. Munier, G.D. Bostic, P.S. Bozigar, and R. Hanna. 2002. Evaluation of a plastic nonvented aerobic blood culture bottle for use with the BacT/ALERT microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4757-4759.
 12. Snyder, J.W., K.S. Benzing, G.K. Munier, G.D. Bostic, P.S. Bozigar, R. Hanna, and M.J. Zervos. 2000. Clinical comparison of nonvented aerobic BacT/Alert blood culture bottle and standard aerobic bottle for detection of microorganisms in blood. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3864-3866.
 13. Thorpe, T.C., M.L. Wilson, J.E. Turner, J.L. DiGuisseppi, M. Willett, S. Mirrett, and L.B. Reller. 1990. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1608-1612.
 14. Weinstein, M.P., S. Mirrett, M.L. Wilson, L.G. Reimer, and L.B. Reller. 1994. Controlled evaluation of five versus ten milliliters of blood cultured in aerobic BacT/Alert blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2103-2106.
 15. Wilson, M.L., S. Mirrett, L.B. Reller, M.P. Weinstein, and L.G. Reimer. 1993. Recovery of clinically important microorganisms from the BacT/Alert blood culture system does not require 7 day testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 31-34.
 16. Wilson M.L., M.P. Weinstein, L.G. Reimer, S. Mirrett, and L.B. Reller. 1992. Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 30, 323-329.
 17. Zwadyk, P., C.L. Pierson, and C. Young. 1994. Comparison of Difco ESP and Organon Teknika BacT/Alert continuous-monitoring blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1273-1279.

(Received June 2, 2008/Accepted June 25, 2008)

ABSTRACT : Detection of Microbial Growth in an Automated Culture System

Hyeran Sung, Il Hoi Kim, Jee Youn Kim, Chong-Kil Lee, Yeon Bok Chung, Sang-Bae Han, and Sukgil Song* (National Research Laboratory of PK/PD, CBITRC, College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea)

Modern automated culture systems have increased the isolation rate of microorganisms and shortened the time to detection, reducing experimental errors in diagnosis of infecting agents. BacT/ALERT 3D system is based on the colorimetric detection of CO₂ produced by the growing microorganisms. In order to evaluate the efficiency of the detection system, sterility test were performed using 6 bacteria. With standard aerobic and anaerobic bottles containing the liquid media, both three aerobic bacteria (*P. aeruginosa*, *M. luteus*, *B. subtilis*) and a facultative bacterium *S. aureus* were detected up to 1 CFU in 31.44 hr. In addition, growth of anaerobic *C. sporogenes* was recognized up to 1 CFU in 15.96 hr. The slowly growing bacteria *P. acnes* was detected up to 10,000 CFU in 129.36 hr. In comparison with conventional culture method, BacT/ALERT 3D automated culture system was more sensitive and saved detection time up to 2~10 hr. Therefore, this automated culture system enables to efficiently detect bacteria in clinical samples and biological medicines.