

장티푸스에서의 N.B.T. 및 Stimulated N.B.T. 檢査*

[연세대학교 의과대학 내과학교실]

선우일남·문 언·고 윤 웅
한 지 숙·김 경 석·채 응 석

I. 서 론

Nitroblue tetrazolium (이하 N.B.T.라함) 색소는 부색의 물질로써 독종의 효소에 의하여 비수용성(非水溶性) 물질인 formazan으로 환원되며 이 formazan은 靑靑色の 結晶으로서 육안적으로 용이하게 관찰될 수 있어 각종 효소의 조직화학적 연구에 많이 이용되고 있다.

1966년 Holmes 등¹⁾이 중독한 만성육아중성질환(fatal chronic granulomatous disease)때의 中性白血球에 있어서 그 貪喰力은 정상이나 살균작용이 감소됨과 아울러 N.B.T. 色素의 환원력 또한 감소함을 관찰한 이래 일반적으로 중성백혈구에 있어서의 살균력과 N.B.T. 색소의 환원력 사이에 직접적인 상관관계가 있음이 시사되어 왔다.²⁻⁴⁾

그후 Park 등⁵⁾은 N.B.T. 색소가 중성백혈구내에서 환원되면 암청색의 formazan 결정으로 변하여 세포질 내에서 용이하게 관찰될 수 있으며 또한 정상인에서나 비세균성 질환에 비해 세균성질환에 있어서 시험관내에서(in vitro 상) N.B.T. 색소를 자동환원(spontaneous reduction)시키는 중성백혈구의 수가 현저히 증가함을 보고하였다. 따라서 N.B.T. 검사는 그후 여러 학자들에 의하여 발열환자에서 세균성질환과 비세균성 질환과의 감별 및 세균성질환의 치료효과를 평가하는 데 많이 이용되어 왔다.⁶⁻¹¹⁾

그러나 1973년 임등¹²⁾은 장티푸스는 세균성질환임에도 불구하고 시험관내에서 N.B.T. 색소를 환원시키는 중성백혈구의 수가 증가하지 않음을 보고하였다. 반대로 김¹³⁾은 장티푸스 환자에서도 다른 세균성질환에서

와 같이 N.B.T. 색소를 환원시키는 중성백혈구수가 여전히 증가한다고 주장한 바 있다. 또한 1970년 Park 및 Good¹⁴⁾은 N.B.T. 검사를 시행할때 시험관내에서 대장균內毒素로 중성백혈구를 자극하였을때도 N.B.T. 검사 양성중성백혈구 수가 증가한다는 실험을 통하여 특정한 질환에 따라 중성백혈구 자체의 살균력을 판별할 수 있음을 시사한 바 있었다.

이에 저자들은 항생제나 부신피질 호르몬의 투여와 같은 전 처치를 받지 않은 장티푸스환자에서 N.B.T. 검사를 시행하여 해당환자의 중성백혈구의 탐식력의 증가여부를 재검토하고 또 시험관내에서 대장균 및 장티푸스균 내독소로 중성백혈구를 자극한 후 N.B.T. 검사를 통하여 장티푸스 환자의 중성백혈구 자체의 살균능력을 관찰하였기에 이에 보고하는 바이다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

1973년 9월부터 1974년 8월까지 12개월간 연세대학교 연세의료원 내과에 입원하여 임상상견과 혈액 및 뇨배양으로 확진된 장티푸스환자 35명과 전강한 성인 27명을 선정하여 N.B.T. 및 stimulated N.B.T. 검사를 시행하였다.

2. 검사방법

1) N.B.T. 용액 제조

생리식염수에 N.B.T. 색소 (Sigma Co. Gread III)를 용해하여 0.2% N.B.T. 용액을 만들고 이 용액에 동일 양의 pH 7.2 phosphate buffer saline을 혼합하여 15분간 3,000 rpm으로 원심분리한후 그 상등액인 0.1% N.B.T. 용액을 시험용액으로 사용하였다.

2) N.B.T. 및 stimulated N.B.T. 검사법

피검자의 정맥으로부터 disposable plastic 주사기로 정맥혈 3ml를 채취하여 dry heparin 50단위를 첨가한

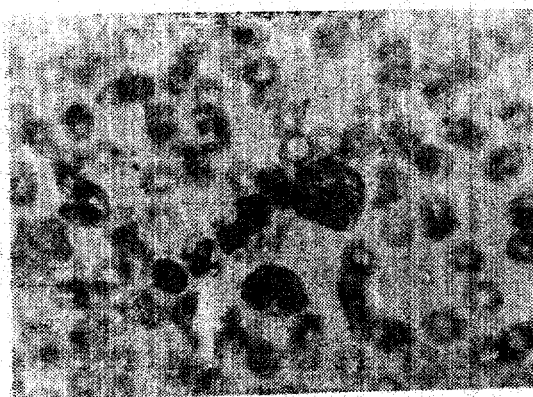
* 本 論文의 要旨는 제26차 대한내과학회 학술대회 (1974. 10. 19.) 석상에서 발표되었으며, 一部는 1973년도 연세대학교 연구위원회의 교수연구비 지원에 의한 것임.

* 接受: 1975년 1월 18일

siliconize 된 청결한 시험관(10×1cm) 3개에 각각 1ml 씩 넣은후 첫째 시험관은 그대로, 둘째 시험관에는 1 ml 당 10^6 의 대장균으로 부터 얻어진 대장균내독소(*Escherichia coli* endotoxin, 국립보건원제조) 0.1 ml, 셋째 시험관에는 1ml당 10^6 의 장티푸스균으로부터 얻어진 장티푸스균내독소(국립보건원제조) 0.1 ml를 각각 첨가하여 혼합한 후 실온(20~25°C)에서 15분간 방치한 후, 각 시험관에서 0.1 ml 씩을 채취하여 siliconize 된 microconcave slide (Clay-Adams, New York)에 놓고 이미 제조한 0.1% N.B.T.액 0.1 ml를 첨가하여 혈구가 파괴되지 않을 정도로 조심스럽게 흔들어 혼합시켰다. 이 microconcave slide 들을 생리식염수에 적신 거즈(gauze)가 담긴 petri dish에 넣어 37°C 에서 15분간 배양한 다음, 다시 실온에서 15분간 방치하였다. 이 slide에 생긴 상등액을 조심스럽게 흡수지로 흡수 제거한 다음 microconcave slide의 바닥에 남은 층을 잘 혼합하여 말초혈액도말표본을 만들며처럼 slide에 얇게 밀어 말린후 Wright stain 으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 상기와정중에서 혈액 1mm³내의 백혈구수와 그 백혈구의 百分率산정을 시행하였다.

3. N.B.T. 검사의 계산법

세포형태가 파괴되지 않고 비교적 완전한 정상윤곽을 가진 중성백혈구내에 formazan 입자들이 암청색으로 염색되어 있는 것을 N.B.T. 양성세포로 계산하였고 formazan 이 단핵백혈구나 혈소판에서 보이는 것과 중성백혈구와 혈소판이 붙어서 하나의 formazan 을 함유하고 있는 것들은 계산에서 제외하였다(도 1). 그러나 두개이상의 중성백혈구가 붙어서 하나의 formazan 을 함유하고 있을 때는 하나의 양성세포로 취급하였다. 그리고 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수는 혈액



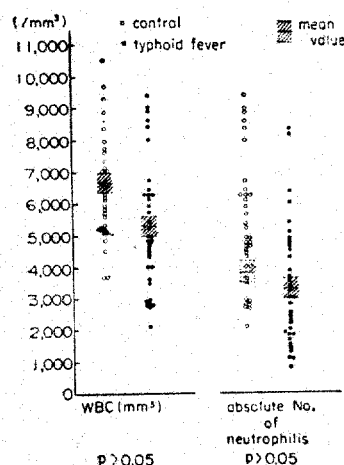
도 1. N.B.T. 검사 양성 중성 백혈구.

1 mm³내의 백혈구수에 곱하기 중성 백혈구의 백분율, 곱하기 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 백분율로 산정하였다.

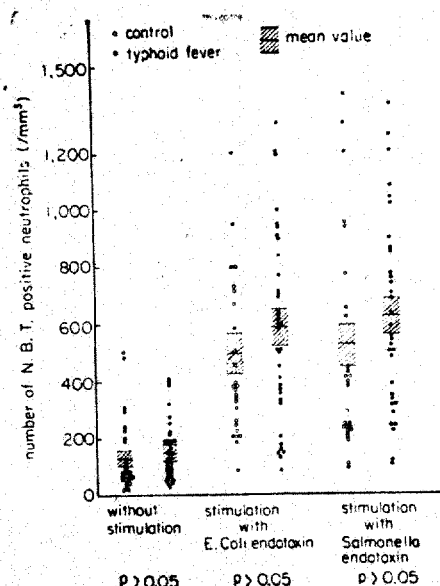
즉, N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수=1 mm³ 내의 백혈구수×중성백혈구의 백분율×N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 백분율.

III. 실험 성적

1. 정상대조군 27명의 백혈구수는 3,650~10,450/



도 2. 정상인과 장티푸스환자의 백혈구수 및 중성백혈구의 분포.



도 3. 정상인과 장티푸스환자의 N.B.T. 및 stimulated N.B.T. 검사 양성중성백혈구절대수의 분포.

표 1. 정상인과 장티푸스환자의 백혈구수 및 중성백혈구수

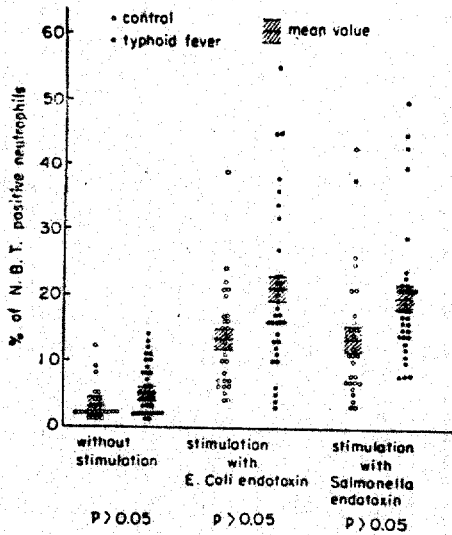
Control				Typhoid fever			
Case	WBC(/mm ³)	Neutrophils		Case	WBC(/mm ³)	Neutrophils	
		Absolute No.	%			Absolute No.	%
1	8,350	5,512	66	1	2,750	1,650	60
2	6,450	3,741	58	2	9,650	3,714	56
3	7,350	3,455	37	3	4,800	3,024	63
4	5,750	3,220	56	4	6,400	3,328	52
5	6,150	3,383	55	5	9,400	8,366	89
6	8,850	7,524	85	6	2,900	1,972	68
7	10,450	5,957	57	7	8,950	4,923	55
8	9,650	8,603	40	8	2,100	1,260	60
9	9,350	5,892	63	9	2,700	810	30
10	7,000	4,480	64	10	2,850	1,568	55
11	7,900	5,530	70	11	5,900	4,484	76
12	6,200	3,348	54	12	8,550	6,413	75
13	4,450	2,092	47	13	6,100	5,063	83
14	6,300	3,780	60	14	5,150	3,863	75
15	4,800	2,844	58	15	5,700	4,332	76
16	5,300	3,127	59	16	8,400	5,964	71
17	3,650	2,263	62	17	6,250	4,688	75
18	7,600	4,104	54	18	4,650	2,976	64
19	3,650	1,241	34	19	6,250	5,375	86
20	7,000	3,990	57	20	4,650	2,790	60
21	5,950	3,008	64	21	3,550	2,201	52
22	5,800	3,944	68	22	4,750	1,900	40
23	7,650	3,902	51	23	4,300	2,365	55
24	5,050	2,220	44	24	4,850	2,280	47
25	7,050	3,384	48	25	2,750	1,128	41
26	5,700	3,306	58	26	3,950	1,541	39
27	6,400	4,964	76	27	4,600	1,794	39
				28	3,350	1,139	34
				29	5,300	3,180	60
				30	3,950	1,915	51
				31	6,300	3,528	56
				32	8,850	9,182	92
				33	4,500	2,520	56
				34	4,850	3,395	70
				35	8,000	4,800	60
Mean	6,660	3,851	57.0		5,280	3,384	60.6
S.E.	331	262	2.2		334	323	2.64

mm³으로 그 평균치는 6,660±331/mm³이었다. 중성 백혈구수는 1,241~5,597/mm³, 평균 3,851±262로 백혈구의 34~85%, 평균 57.0±2.2%이었다(표 1 및 도 2). 대조군의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수는

13~496/mm³으로 그 평균치는 136±25/mm³이었으며 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 전중성백혈구에 대한 백분율은 1~12%로 그 평균치는 3.2±0.5%이었다(표 2, 도 3 및 도 4). 대조군에서 대장균내독소로 자극하

표 2. 정상인과 장티푸스환자의 N.B.T. 검사 및 stimulated N.B.T. 검사

Control							Typhoid fever						
Case	Without stimulation		Stimulation with E. coli endotoxin		Stimulation with Salmonella endotoxin		Case	Without stimulation		Stimulation with E. coli endotoxin		Stimulation with Salmonella endotoxin	
	Absolute No.	%	Absolute No.	%	Absolute No.	%		Absolute No.	%	Absolute No.	%	Absolute No.	%
1	496	9	485	7	441	8	1	149	9	315	19	281	17
2	187	5	524	14	973	26	2	186	5	371	10	520	14
3	69	2	242	7	380	11	3	121	4	333	11	242	8
4	64	2	322	10	225	7	4	133	4	166	5	333	10
5	68	2	203	6	203	6	5	167	2	837	10	1,255	15
6	226	3	1,024	16	226	3	6	39	2	454	23	375	19
7	60	1	953	16	1,251	21	7	98	2	197	4	1,044	21
8	309	8	579	15	618	16	8	50	4	76	6	101	8
9	295	5	353	6	412	7	9	57	7	130	16	105	13
10	90	2	672	15	941	21	10	31	2	251	16	220	14
11	221	4	221	4	774	14	11	269	6	583	13	493	11
12	67	2	201	6	234	7	12	321	5	898	14	770	12
13	42	2	84	4	230	11	13	405	8	608	12	1,215	24
14	76	2	378	10	416	11	14	39	1	155	4	309	8
15	28	1	370	13	427	15	15	217	5	910	21	693	16
16	63	2	344	11	219	7	16	119	2	954	16	1,013	17
17	23	1	181	8	226	10	17	94	2	938	20	844	18
18	123	3	205	5	205	5	18	89	3	506	17	625	21
19	13	1	298	24	186	15	19	54	1	699	13	1,075	20
20	489	12	798	20	1,516	38	20	84	3	614	22	586	21
21	114	3	800	21	647	17	21	131	6	374	17	330	15
22	79	2	454	12	99	3	22	209	11	608	32	760	40
23	59	2	254	7	293	8	23	189	8	639	27	544	23
24	44	2	377	17	89	4	24	182	8	502	22	502	22
25	68	2	711	21	389	12	25	147	13	507	45	327	29
26	99	3	727	22	1,405	43	26	185	12	693	45	693	45
27	195	4	1,897	39	1,186	25	27	251	14	987	55	897	50
							28	114	10	410	36	239	21
							29	64	2	1,193	38	1,367	43
							30	192	10	345	18	306	16
							31	388	11	1,200	34	741	21
							32	407	5	1,303	16	1,466	18
							33	763	3	580	23	554	22
							34	51	2	713	21	475	14
							35	96	2	768	16	864	18
Mean	136	3.2	506	13.2	526	13.7	Mean	154	5.5	595	21.6	633	20.1
S.E.	25	0.5	72	1.5	80	1.9	S.E.	18	0.6	54	2.1	61	1.7



도 4. 정상인과 장티푸스 환자의 N.B.T. 및 stimulated N.B.T. 검사) 양성 중성백혈구 백분율의 분포.

였을때의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수는 $84 \sim 1,897/\text{mm}^3$ 으로 그 평균치는 $506 \pm 72/\text{mm}^3$ 이었고 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 전 중성백혈구에 대한 백분율은 $4 \sim 39\%$ 로 그 평균치는 $13.2 \pm 1.5\%$ 로서 내독소로 자극하기전의 성적에 비하여 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$) (표 2, 도 3 및 도 4). 대조군에서 장티푸스균내독소로 자극하였을 때의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수는 $89 \sim 1,516/\text{mm}^3$ 그 평균치는 $526 \pm 80/\text{mm}^3$ 이었으며 백분율은 $3 \sim 43\%$, 평균치 $13.7 \pm 1.9\%$ 로써 이 역시 내독소로 자극하기전의 성적에 비하여 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.01$) (표 2, 도 3 및 도 4). 그러나 표 2에서 표시된 바와 같이 대장균내독소로 자극하였을 때와 장티푸스균 내독소로 자극하였을 때의 N.B.T. 검사 양성치 사이에는 별로 의의있는 차이가 없었다($p > 0.05$).

2. 장티푸스환자 35명의 백혈구수는 표 1 및 도 2에서와 같이 $2,700 \sim 9,400/\text{mm}^3$, 평균치는 $5,280 \pm 334/\text{mm}^3$ 이었고 그중 중성백혈구의 절대수는 $810 \sim 8,366/\text{mm}^3$ 평균 $3,384 \pm 323/\text{mm}^3$ 이었으며 그 백분율은 $30 \sim 89\%$, 평균 $60.6 \pm 2.6\%$ 로서 정상대조군에 비하여 백혈구수 및 중성백혈구수에 있어서 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 장티푸스 환자군에서의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수는 표 2에서 보는 바와 같이 $39 \sim 407/\text{mm}^3$, 평균 $154 \pm 18/\text{mm}^3$ 이었고 그 백분율은 $1 \sim 14\%$, 평균 $5.5 \pm 0.6\%$ 로 정상대조군에 비하여 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 그러나 대장균내

독소로 자극하였을 때의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수의 절대수는 $76 \sim 1,303/\text{mm}^3$, 평균치 $595 \pm 54/\text{mm}^3$ 이었고, 그 백분율은 $4 \sim 55\%$, 평균 $21.6 \pm 2.1\%$ 로 정상 대조군에서와 유사한 증가를 보였다(표 2, 도 3 및 도 4). 또 장티푸스균내독소로 자극하였을때의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의, 절대수는 $101 \sim 1,466/\text{mm}^3$, 평균치 $633 \pm 61/\text{mm}^3$ 였고 그 백분율은 $8 \sim 50\%$, 평균 $20.1 \pm 1.7\%$ 로 역시 정상대조군에서와 같은 정도의 증가를 보였다(표 2, 도 3 및 도 4).

VI. 총괄 및 고안

정상인에서 일부 중성백혈구가 시험관내에서 N.B.T. 색소를 자동환원(spontaneous reduction)시킬 수 있다는 사실은 Baehner 및 Nathan⁴⁾과 Windhorst 등³⁾에 의해 관찰된 바 있으나 그 확실한 기전에 대하여는 아직 규명되어 있지 않다. Holmes 등¹⁵⁾은 중성백혈구가 미립자를 탐식할때 중성백혈구내의 glutathione peroxidase 효소계가 자극을 받아 과산화수소(H_2O_2)가 생성되고 이로 인하여 N.B.T. 색소가 환원될 것이라고 설명한바 있으며, Baehner 및 Nathan⁴⁾과 Mandell 등¹⁶⁾은 중성백혈구가 미립자를 탐식할때 NADH oxidase가 활성화되어 N.B.T. 색소를 환원시킨다고 주장하였다. 이에 반하여 Park¹⁷⁾은 N.B.T. 색소가 중성백혈구의 세포막을 투과할 수 없다는 사실을 들어 N.B.T. 색소가 환원되기 위해서는 우선 세포막에 모종의 변화가 일어나야 하고, 다음에 세포질내의 과립(granules)에서 N.B.T. diaphorase가 유리됨으로써 환원형의 pyridine nucleotide로부터 수소이온을 옮겨 주기 때문에 N.B.T. 색소를 환원시킨다고 설명하였다. 그리고 시험관내에서 세균 자체는 물론 세균내독소, staphylococcal protein-A, streptolysin-O 등을 첨가할 경우에도 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수가 현저히 증가하고 또한 인체에 장티푸스 vaccine을 주사할때 역시 수시간내에 N.B.T. 치가 급격히 증가한다는 사실로 미루어 세균의 어떠한 성분이나 또는 그 대사생성물질도 세균탐식때와 비슷하게 중성백혈구에 대한 대사변화를 초래할 것이라고 추정하였다. 따라서 시험관내에서 상가물질을 첨가하여 N.B.T. 검사를 시행할 경우 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수가 의의있게 증가한다면 반대로 중성백혈구 자체의 탐식작용이나 살균력에 이상이 없음을 간접적으로 증명한다고 할 수 있다.

세균성질환이 있음에도 불구하고 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수의 증가가 없다고 보고된 경우에는 중독

한 만성육아중성질환 (fatal chronic granulomatous disease)은 물론 만성혈관질환, alcohol 중독, influenza, 당뇨병과 같은 합병증이 있을때 등을 들 수 있다. 또한 세균성질환이라도 국소감염(local infection)이나 만성감염일 때는 N.B.T. 치가 증가하지 않는 것으로 보고 되었다¹⁰⁾. 특히 폐결핵환자에서는 일반적으로 N.B.T. 치가 증가하지 않는다고 알려져 있다.^{5,12)}

장티푸스는 급성세균성 질환이나 중성백혈구의 증가를 동반하지 않으며 장티푸스균이나 그 내독소가 주로 소장 및 임파조직, 비장 및 골수등의 망상내재 (reticuloendothelial system)에 의하여 처리되는 점에서 다른 세균성질환에 비하여 다소 특이한 세균성 질환이라 할 수 있다. 이때 중성백혈구 수가 증가하지 않든가 오히려 감소하는 기전에 관하여는 장티푸스균 내독소의 작용에 의한다는 설명은 있으나¹⁷⁾, 아직도 확실히 규명된 바는 아니며 또한 이때의 중성백혈구가 장티푸스균이나 내독소의 처리과정에서 어느정도로 참여하는가는 의문이다.

1973년 김¹⁸⁾은 장티푸스환자에서 시행한 N.B.T. 검사 양성인 중성백혈구수가 다른 세균성 질환에서와 같이 현저히 증가한다고 보고하면서 장티푸스균 및 그 내독소가 망상내재의 단핵세포에 의해서 뿐만 아니라 중성백혈구에 의해서도 처리될 가능성이 있다고 하였다. 그러나 임동¹²⁾은 같은 실험을 통하여 장티푸스는 세균성질환임에도 불구하고 N.B.T. 검사 양성 중성백혈구 수가 정상이라고 보고하였고 또한 Sobel 등¹¹⁾과 Ng 등¹⁹⁾도 비록 예수는 적으나 장티푸스 환자에서의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수가 역시 정상임을 보고한 바 있다. 한편 Grush 및 Maurer¹⁹⁾은 정상인에 장티푸스 vaccine 을 주사할 때 수시간내에 N.B.T. 검사 양성세포수가 급격히 증가한다고 보고하였다. 이러한 상반된 보고에 대한 이유는 알 수 없으나 이는 장티푸스균 감염후의 시간적 차이에 따라 N.B.T. 검사 성적이 각기 다를 것이라는 가능성을 제시한 바가 있다¹²⁾. 그러나 보고된 환자의 대부분이 발열상태에서 N.B.T. 검사를 시행한 사실로 보아 이러한 설명도 충분한 것이 못된다고 하겠다. 한편 장티푸스 환자에서 중성백혈구의 탐식능력에 대한 이상여부에 관하여는 아직 알려진 바 없으나 만일 N.B.T. 검사치가 정상인 경우라면 중성백혈구의 탐식 및 살균력이 감소되어 있을 가능성을 배제할 수는 없을 것이다. 본 실험에서 장티푸스 환자에 대한 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 백분율의 평균치가 5.5 ± 0.6 으로 대조군의 3.4 ± 0.5 보다 약간 높은 치를 보이나 통계학적으로 유의한 차

이가 없음으로 이는 임동¹²⁾의 보고와 일치한다. 그러나 시험관내에서 대장균내독소로 자극하였을 경우 정상인 대조군에서와 비슷한 정도의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수의 증가를 보였는데 이는 장티푸스 환자에서 중성백혈구 자체의 탐식력 및 살균력에는 이상이 없음을 시사해 주고 있다. 또한 시험관내에서 장티푸스균내독소로 자극하였을 때도 대장균내독소로 자극하였을 때와 같은 정도의 증가를 보인바, 적어도 이러한 사실은 시험관내에서는 중성백혈구가 대장균내독소는 물론 장티푸스균 내독소에 의해서도 자극될 수 있음을 시사해 주고 있다. 장티푸스의 발열 원인이 내독소에 의한 것으로 알려진 바²⁰⁾, 체내에서 중성백혈구가 그 내독소에 의해 자극되어 있지 않은 점은 현재로서는 설명할 수 없으나 장티푸스균 내독소가 매우 신속하게 망상내재의 단핵세포들에 의해 처리되기 때문일 가능성은 생각해 볼 수 있다. 이는 앞으로 장티푸스환자에서 혈중내독소치 측정과 N.B.T. 검사를 동시에 시행함으로써 상기 가능성을 정확히 판단할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 주로 망상내재에 의해 처리되는 것으로 알려진 眞菌감염에 대한 N.B.T. 검사는 본 실험에서 보여준 장티푸스 환자에서의 N.B.T. 검사 결과를 뒷받침하는데 도움이 될것으로 사료되며 앞으로 더 추궁해야 할 문제라고 생각된다. 마지막으로 N.B.T. 검사는 이상과 같은 논거로서 임상적으로 급성 세균성질환을 진단함에 있어서 충분히 이용할 가치있는 보조적인 진단방법임을 부언하여 둔다.

V. 결 론

건강한 성인 27명과 확진된 장티푸스환자 35명에 대한 N.B.T. 및 stimulated N.B.T. 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상인과 장티푸스 환자에서의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구의 절대수 및 백분율의 평균치 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.
2. 시험관내에서 대장균내독소로 자극하였을 때의 N.B.T. 검사 양성중성백혈구 수가 증가하는 정도에도 정상인과 장티푸스 환자 사이에 별 차이가 없었다.
3. 시험관내에서 장티푸스균내독소 자극에 의한 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수 역시 정상인과 장티푸스 환자와의 경우 거의 비슷한 정도로 증가하였다.
4. 정상인이나 장티푸스 환자에서 내독소에 의하여 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수가 증가하는 바 사용량, 내독소 사이에 자극되는 정도에는 유의한 차이가 없

었다.

이상과 같은 결과로써 장티푸스 환자에서 N.B.T. 검사 양성중성백혈구수는 다른 세균성질환에서와 같이 증가하지 않으나 시험관내에서 내독소에 의해 N.B.T. 검사가 정상인에서와 같은 증가를 보여준 점으로 보아 장티푸스 환자의 중성백혈구 자체의 탐식 및 살균 작용에는 이상이 없는 것으로 사료되었다.

=Abstract=

NBT and Stimulated NBT Test in Typhoid Fever

Il Nam Sunwoo, M.D., Un Moon, M.D., Yun Woong Ko, M.D., Jee Sook Hahn, M.D., Kyung Suk Kim, M.D. and Eung Suk Chai, M.D.

*Department of Internal Medicine
Yonsei University College of Medicine*

Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) dye has been widely used in histochemical studies of various enzymes. At the site of enzyme activity, colorless tetrazolium is reduced to a water-insoluble formazan which can easily be recognized as a deep blue deposit.

Since Holmes et al. (1966) described patients whose neutrophils are capable of engulfing but unable to kill the bacteria and demonstrated N.B.T. dye could not be reduced to formazan in these patients it has been suggested that there is close relationship between the ability of neutrophils to reduce N.B.T. dye and to kill the bacteria after phagocytosis.

Although the mechanism of reduction of N.B.T. to form formazan in phagocytic neutrophils is unclear. Park et al. (1968) reported that the number of neutrophils reducing N.B.T. dye in vitro was significantly elevated in patients with acute systemic bacterial infection. Since then N.B.T. test has been used as a means of differentiating bacterial from non-bacterial infection in febrile patients. It was however, learned later that N.B.T. values were not increased in the presence of bacterial infection if corticosteroid was given or complicated by chronic

vascular disease, [diabetes mellitus, influenza, and alcoholic intoxication. Local infection and chronic infection are also known to be showing normal N.B.T. values though there is considerable controversy on this issue.

In 1973, Kim observed high N.B.T. values in patients with typhoid fever and postulated that typhoid bacilli and/or their products might play significant role in activating neutrophils as well as mononuclear cells in reticuloendothelial system. On the contrary, Lim et al (1973) reported N.B.T. positive neutrophils are not increased in patients with typhoid fever through the same experiment. There has been no explanation for these different observation yet. Grush and Mauer (1969) showed instant rapid rise of N.B.T. positive neutrophils when typhoid vaccines were given to healthy people.

Park (1971) also introduced a simple technique testing intrinsic defect of neutrophils to phagocytize and kill bacteria, when N.B.T. values are not increased in the presence of acute bacterial infection, by observing significant rise in N.B.T. positive neutrophils when *Escherichia coli* endotoxin is added in vitro.

The purpose of the present study was to determine if N.B.T. positive neutrophils are increased in typhoid fever as in other bacterial infection and there is intrinsic defect of neutrophils in phagocytizing and killing bacteria, by performing stimulated N.B.T. test.

N.B.T. and stimulated N.B.T. test with *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* endotoxin was performed on 27 healthy adults and 35 patients with typhoid fever by the same method of Park (1968, 1971). The summary of the results are as following.

1. There was no significant difference in white blood cell count and absolute number of neutrophils between normal control and typhoid fever, mean value being $6,660 \pm 331/\text{mm}^3$, $3,851 \pm 262/\text{mm}^3$ and $5,280 \pm 334/\text{mm}^3$, $3,384 \pm 323/\text{mm}^3$ respectively.

2. Though the mean percentage of N.B.T. positive neutrophils in typhoid fever was slightly higher than control (typhoid fever: 5.5 ± 0.6 , control: 3.4 ± 0.5), there was no statistically significant difference ($p > 0.05$).

3. Significant increase in number of N.B.T. positive neutrophils was observed when it was stimulated by Escherichia coli and Salmonella typhi endotoxin in vitro (control with E. coli endotoxin: $13.2 \pm 1.5\%$, control with Salmonella typhi endotoxin: $13.7 \pm 1.9\%$, typhoid fever with E. coli endotoxin: $21.6 \pm 2.1\%$ and typhoid fever with Salmonella typhi endotoxin: $20.1 \pm 1.7\%$).

4. There was no meaningful difference in the degree of stimulation either between control and typhoid fever or between E. coli endotoxin and Salmonella typhi endotoxin.

It might be concluded that while the number of neutrophils reducing N.B.T. dye in typhoid fever is not elevated as in other bacterial infection there appears to be no intrinsic defect in neutrophils to phagocytize and kill bacteria. The possible mechanism of failure to increase N.B.T. values in typhoid fever was discussed.

REFERENCES

- 1) Holmes, B., Quie, P.G., Windhorst, D.B. and Good, R.A.: *Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. Lancet* 1:1225, 1966.
- 2) Baehner, R.L. and Nathan, D.G.: *Deficient glucose oxidation in intact leukocytes of chronic granulomatous disease. Blood*, 28:1010, 1966.
- 3) Windhorst, D.B., Holmes, B. and Good, R.A.: *A newly defined X-linked trait in man with demonstration of Lyon effect in carrier females. Lancet* 1:737, 1967.
- 4) Baehner, R.L. and Nathan, D.G.: *Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. New Engl. J. Med.*, 278:971, 1968.
- 5) Park, B.H., Fikrig, S.M. and Smithwick, E.M.: *Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic aid. Lancet* 2:532, 1968.
- 6) Park, B.H., South, M.A. and Barrett, F.F.: *The use of the nitroblue tetrazolium reduction(N.B.T.) test in diagnosis and treatment of bacterial endocarditis. Pediatr. Res.*, 4:463, 1970.
- 7) Feigin, R.D.: *Nitroblue tetrazolium dye test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. J. Pediatr.*, 78:230, 1971.
- 8) Park, B.H.: *The use and limitation of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. J. Pediatr.*, 78:376, 1971.
- 9) Matula, G. and Paterson, P.Y.: *Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. New Engl. J. Med.*, 285:311, 1971.
- 10) Humbert, J.R., Melvin, I.M., Hathaway, W.E. and Thoren, C.H.: *The histochemical nitroblue tetrazolium reduction test in the differential diagnosis of acute infections. Pediatrics*, 38:259, 1971.
- 11) Sobel, J.D., Obedeau, N., Blank, S., Levy, I., Valero, A. and Merzbach, D.: *The nitroblue tetrazolium test in the investigation of febrile patients. South Afr. Med. J.*, 47:1408, 1973.
- 12) 임용의, 홍천수, 채일석, 김경석, 채응석 : 감염질환에 대한 N.B.T. 검사. 대한내과학회잡지 16:35, 1973.
- 13) 김병국 : 장티푸스 및 각종 감염성질환에서 말초혈액 중성구의 Nitroblue tetrazolium 색소 환원에 관한 연구. 대한내과학회잡지 16:41, 1973.
- 14) Park, B.H. and Good, R.A.: *Nitroblue tetrazolium test stimulated. Lancet* 2:616, 1970.
- 15) Holmes, B., Page, A.R. and Good, R.A.: *Studies of metabolic activity of leukocytes from patients with genetic abnormality of phagocytic function. J. Clin. Invest.* 46:1422, 1967.
- 16) Mandell, G.L., Rubin, W. and Hook, E.W.: *Alteration of bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophils by NADH oxidase inhibitor. J. Clin. Invest.* 48:55, 1969.
- 17) Davidsohn, I. and Hennry, J.B.: *Clinical diagnosis. Philadelphia, Pa., W.B. Saunders Co., 14th ed.*, 1969.
- 18) Ng, R.P., Chan, T.K. and Todd, D.: *N.B.T. test—false-negative and false-positive results. Lancet* 1:1341, 1972.
- 19) Grush, O.C. and Mauer, A.M.: *Neutrophil function and NBT dye reduction. Lancet* 2:883, 1969.
- 20) Morgan, H.R.: *Bacterial and mycotic infections of man. Philadelphia and Montreal, Lippincott, 4th Ed.*, 1965.