

Microplate를 이용한 장내세균 동정법

어 영, 손정석, 황규열, 장인호, 윤갑준, 서동민*

연세대학교 원주의과대학 임상병리학과교실, 전산실*

Microplate Identification System of *Enterobacteriaceae*

Young Uh, Jeong Seog Son, Gyu Yel Hwang, In Ho Jang, Kap Jun Yoon and Dong Min Seo*

Departments of Clinical Pathology and Medical Information Development,
Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea*

Background : To access the accuracy and clinical usefulness of microplate identification (ID) system for the identification of *Enterobacteriaceae*, we compared microplate ID system with API 20E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)

Methods : Ninety-two cultures of *Enterobacteriaceae* and one isolate of *Aeromonas* species were simultaneously identified by microplate ID system and the API 20E. Twenty biochemical tests used in microplate ID system were lactose, sucrose, and H₂S in Kligler's iron agar media; indole, sucrose, raffinose, arabinose, trehalose, adonitol, dulcitol, sorbitol, cellubiose, methy-red, phenylalanine deaminase, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase, urease, and citrate in microplate; and oxidase test. The identification was obtained by considering percent likelihood (%ID), modal frequency and ID score method.

Results : Among the 92 cultures of *Enterobacteriaceae* and one isolate of *Aeromonas* species, agreement rate of identification according to the %ID between microplate ID system and API 20E were 90.3% to the species level and 97.8% to the genus level.

Conclusions : For the identification of clinical *Enterobacteriaceae* isolates, the microplate ID system compares favorably with API 20E in identification accuracy and have the advantage of cost-saving and easy to use. (*Korean J Clin Microbiol* 1999;2:135-143)

Key Words : *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, Microplate identification system, API 20E

서론

원주기독병원에서 1998년부터 장내세균의 동정법으로 사용하고 있는 10 tube 법[1]은 동정 정확도가 높고 검사 비용이 저렴한 장점이 있으나, 10개의 시험관 동정 배지에 집락을 일일이 접종해야 하므로 작업량이 과

다하고 한 개의 시험관 배지에서 세 가지의 생화학 시험을 판독하는 motility-indole-ornithine decarboxylase agar 배지의 운동성과 ornithine decarboxylase (이하 ORD로 약함) 시험은 균종에 따라 객관적인 판독이 어려운 경우가 있었으며 urease 시험은 *Klebsiella* 균속에서 약 양성을 보이는 균주가 있었고, phenylalanine deaminase 시험 (이하 PAD로 약함)과 citrate 시험은 양성 반응이 뚜렷하지 않은 경우가 있었으며 *Enterobacter* 균속의 감별력이 낮은 문제점 등이 있었다[2].

이에 저자들은 10 tube 법의 문제점을 해결하고자 Kligler's iron agar (이하 KIA로 약함) 배지에서의 반응, microplate well에서 시험하는 16개의 생화학 시험과 oxidase 시험의 20가지의 생화학 시험으로 구성된 동정법을 고안하였으며 아울러 동정 프로그램을 보완하였다.

원 본 접수 : 1999년 8월 9일 접수번호 : CM 99-2-8
수정본접수 : 1999년 8월 27일

교신저자 : 어 영

220-701 강원도 원주시 일산동 162

원주기독병원 임상병리과

전화 : 0371-741-1593 Fax : 0371-731-0506

* 이 연구는 1998년도 연세대학교 원주의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

재료 및 방법

1. 배지 및 지시제의 제조

Microplate를 이용한 장내세균 동정법의 시험 종목과 순서는 KIA 배지의 사면과 고층에서의 산생성과 H₂S 생성 시험, microplate의 indole 시험, sucrose (Junsei Chemical Co., Japan), raffinose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA), arabinose (Sigma), trehalose (Janssen Chimira, Japan), adonitol (Sigma), dulcitol (Sigma), sorbitol (Sigma) 및 cellubiose (Sigma)의 8가지 당발효시험, methyl-red, PAD, ORD, lysine decarboxylase (이하 LDC로 약함), arginine dihydrolase (이하 ARD로 약함), urease 및 citrate 시험의 16가지와 oxidase 시험을 포함하여 20가지로 구성하였다. Microplate에서의 indole 시험은 SIM 배지(BBL, Cockeysville, Md., USA)를, 8가지 당발효 시험은 당 용액을 syringe filter로 여과한 후 phenol red agar (BBL) 배지에 첨가하여 최종 당농도가 1%가 되도록 제조하였다. Methyl-red 시험은 MR-VP broth 배지(BBL)에 기초한천배지(BBL)를 첨가하여 제조하였고, PAD 시험은 phenylalanine 배지 (BBL)를, ORD, LDC와 ARD 시험은 Moeller decarboxylase broth base (BBL)에 한천과 L-ornithine (Merck Co., NJ, USA),

L-lysine (Sigma), L-arginine (Junsei Chemical Co., Japan)이 1% 농도가 되도록 첨가한 배지를 사용하였으며, urease 시험은 urea agar base 배지(BBL)로 만든 urea 용액을 syringe filter로 여과하여 기초한천배지(BBL)에 첨가한 배지를, citrate 시험은 Simmons citrate agar 배지(BBL)를 이용하였다. 각 배지는 제조회사의 권장방법대로 제조한 후 pH를 보정하여 8개의 microplate well이 한 줄씩 날개로 구성된 96 well microplate (Nunc, Denmark)에 250μL씩 분주한 뒤 테이프로 밀봉한 다음 비닐 주머니에 넣어 4℃ 냉장고에 보관하였다.

Methyl-red 시험의 지시제는 methyl red (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 0.01g을 95% ethyl alcohol 30 mL에 녹인 후 20 mL의 증류수를 넣어 제조하였고, indole 시험의 지시제는 p-dimethylaminobenzaldehyde (Sigma) 1g을 isoamyl alcohol 15 mL에 녹인 후 HCl 5 mL를 천천히 넣어 제조하였으며 PAD 시험 지시제는 ferric chloride (Hayashi Pure Chemical, Japan) 12 g을 2.5 mL HCl로 녹인 다음 100 mL의 증류수를 넣어 제조하였다.

2. 접종과 판독방법

평판배지에 1람음성간균이 순수 분리될 경우에는 4

미생물 검사
[-][M][X]

파일 W/S AST 인쇄 통계 Delta Check 신속검사

작업번호 990728 M3 0031 병원번호 00000010 이름 한상문 나이 39 성별 M

주민번호 600101-1268529 병동 진료과 주치의 보고일자 990728

검사코드	검체	검 사 명	검체명	항균제	염색결과	S	수	균종명	S	감수성	S	최종
8MGBACG3 UY	Genitourinary T	bacteria	Urine			Y			Y			

구분	정도	번호	종류	선택	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
M		1	ENT	+/-	PYR	N-E	MAN	SBL	ADH	ARA	RAF	SUC	MGP	RIB	PIG	B-H									
		EFA																							
M		2	GNB	+/-	GLU	LAC	H2S	IND	SUC	RAF	ARA	TRE	ADO	DUL	SOR	CEL	M-R	PAD	ORD	LDC	ARD	URE	CIT	OXI	
현		U5																							

구분 M
번호 2
종류 GNB
정도 U5
균종

K I A

+

-

-

+

-

-

+

+

-

-

-

+

+

-

+

+

-

-

-

+

-

-

-

전송

종료

코드
Rule Check 결과

인쇄

Fig. Main screen of microplate ID system for *Enterobacteriaceae*

미생물 검사

파일 W/S AST 인쇄 통계 Delta Check 신속검사

작업번호 990728 M3 0031 병원번호 00000010 이름 한상문 나이 39 성별 M

주민번호 600101-1268529 병동 진료과 주치의 보고일자 990728

검사코드 8MGBACG3 UY 검체 Genitourinary T bacteria Urine 항균제 염색결과 S 수 균종명 S 감수성 S 최종

종료 인쇄 Microplate Enterobacteriaceae ID System

Unacceptable profile

ID by probability	% ID	Modal Frequency
EBA Escherichia blattae	64.5 %	37.5 %
HAL Hafnia alvei	35.2 %	20.5 %
ECI Escherichia coli	0.1 %	0.1 %
SHD Shigella sonnei	0.1 %	0.0 %

Comments
Escherichia blattae: 임상검체에서 분리되는 경우가 거의 없습니다.
Lysine decarboxylase 결과 확인이 필요합니다.

	Motility	Gas
EBA	0%	100%
HAL	0%	0%

Fig. 2. Screen showing identification results of microplate ID system.

지 접종침(4개의 well에 동시에 접종할 수 있도록 고안한 접종침)을 이용하여 microwell에 접종하였으며, 평판배지에 집락이 섞여 있을 경우에는 일반적인 접종침을 이용하여 접종한 후 ORD, LDC, ARD, urease 및 당분해 시험 배지에는 oil을 두 방울 떨어뜨린 다음 35℃ 호기성 배양기에서 18-24시간 배양하였다. Microplate 밑에는 습도를 유지하기 위하여 물을 적신 거즈를 놓았다.

Microplate 배지의 당분해시험은 노란색이면 양성, 적색이나 분홍이면 음성으로 판독하였고 methyl-red 시험은 methyl red 지시제를 두 방울 떨어뜨린 후 적색이면 양성, 노란색이면 음성으로 판독하였으며, indole 시험은 kovacs 시약을 두 방울 첨가한 후 가볍게 흔들어 분홍빛 층이나 선이 생성되면 양성으로 판독하였고, PAD 시험은 ferric chloride 지시제를 첨가한 후 녹색을 띄면 양성으로 판독하였다. ORD, LDC 및 ARD 시험은 자색을 띄면 양성, 노랑이나 흐린 자색을 띄면 음성으로 판독하였고 urease 시험은 분홍색이면 양성으로 판독하였으며 citrate 시험은 배지 전체가 청색으로 변하면 양성으로 판독하였다.

3. 동정 프로그램

판독결과는 마우스나 자판기를 이용하여 입력한 후

동정확인칸 또는 enter 키를 누르면 동정결과가 화면에 표시되며 균종의 감별을 위하여 추가시험이 필요한 동정코드는 comment가 표시되도록 하였고 동정결과와 인쇄는 A4 용지를 사용하였다(Fig. 1, Fig. 2). 균 동정방법은 균종별 생화학 성상 양성률[3-9] 자료를 토대로한 동정확률법[10,11]과 identification (ID) score 법을 이용하였다. ID score 법은 1998년동안 원주기독병원에서 분리된 장내세균의 분리빈도를 균종별 동정코드수로 나눈 값에 균종별 동정코드목록과 불일치를 보이는 생화학반응 양성률을 곱하여 산출하였다. Microplate 장내세균 동정법의 해석 기준은 %ID (동정확률)와 ID score가 가장 높은 균종이 일치하지 않으면 unacceptable profile로 정의하였고, %ID와 ID score가 가장 높은 균종이 일치하는 경우에는 %ID와 modal frequency에 따라 동정결과를 판독하였으며 unacceptable profile과 doubtful profile로 분류되는 균종 중에서 동일 군속에 속하는 균주들의 %ID 합에 따라 0.99이상이면 excellent identification of genus, 0.95-0.99사이이면 very good identification of genus로, 0.90-0.95사이이면 good identification of genus로 정의하였다(Table 1). 또한 균종간 동정 시험의 양성률을 비교할 수 있도록 고안한 동정시험 분석 화면은 사용자가 비교하고자 하는 균종들과 동정 시험을 선택한 후 추가 및 삭제할

Table 1. Identification profiles of microplate ID system for the identification of *Enterobacteriaceae*

Options of ID results	Profile class
Discrepant ID code between %ID and ID score	Unacceptable profile
Concordant ID code between %ID and ID score	
1. %ID $\geq$ 0.99	
and modal frequency $\geq$ 0.1	Excellent identification
and modal frequency $\geq$ 0.01	Very good identification
and modal frequency $<$ 0.01	Doubtful profile
2. %ID $\geq$ 0.95	
and modal frequency $\geq$ 0.25	Excellent identification
and modal frequency $\geq$ 0.1	Very good identification
and modal frequency $\geq$ 0.01	Good identification
and modal frequency $<$ 0.01	Doubtful profile
3. %ID $\geq$ 0.90	
and modal frequency $\geq$ 0.5	Excellent identification
and modal frequency $\geq$ 0.25	Very good identification
and modal frequency $\geq$ 0.1	Good identification
and modal frequency $\geq$ 0.01	Acceptable identification
and modal frequency $<$ 0.01	Doubtful profile
4. %ID $\geq$ 0.85	
and modal frequency $\geq$ 0.75	Excellent identification
and modal frequency $\geq$ 0.5	Very good identification
and modal frequency $\geq$ 0.25	Good identification
and modal frequency $\geq$ 0.1	Acceptable identification
and modal frequency $\geq$ 0.01	Doubtful profile
and modal frequency $<$ 0.01	Unacceptable profile
5. %ID $\geq$ 0.80	
and modal frequency = 1	Excellent identification
and modal frequency $\geq$ 0.75	Very good identification
and modal frequency $\geq$ 0.5	Good identification
and modal frequency $\geq$ 0.25	Acceptable identification
and modal frequency $\geq$ 0.1	Doubtful profile
and modal frequency $<$ 0.1	Unacceptable profile
6. %ID $<$ 0.80	Unacceptable profile
7. According to sum of %ID of same genus	
$\geq$ 0.99	Excellent identification of genus
$\geq$ 0.95	Very good identification of genus
$\geq$ 0.90	Good identification of genus

수 있도록 구성하였다(Fig. 3).

4. Microplate 동정법의 평가

1999년 5월 중에 임상검체에서 분리된 그람음성간균 85균주와 *Escherichia coli* 표준균주(ATCC 25922) 1주 및 -70°C 에 냉동보관하였던 *Salmonella typhi*, *Salmonella* group B, *Salmonella* group C, *Salmonella* group D, *Salmonella* group E 및 *Shigella sonnei* 각 한 주씩을 무작위로 택하여 10 tube 법, microplate 장내세균

동정법 및 API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 동시에 시험하였다. Microplate 법과 API 20E에서 *Salmonella* species로 동정될 경우에는 균종수준까지 일치하는 것으로 정의하였다.

결 과

Microplate 법과 API 20E에서 %ID (동정확률)가 90% 이상인 균주는 각각 78균주(83.9%)와 72균주(77.4%)

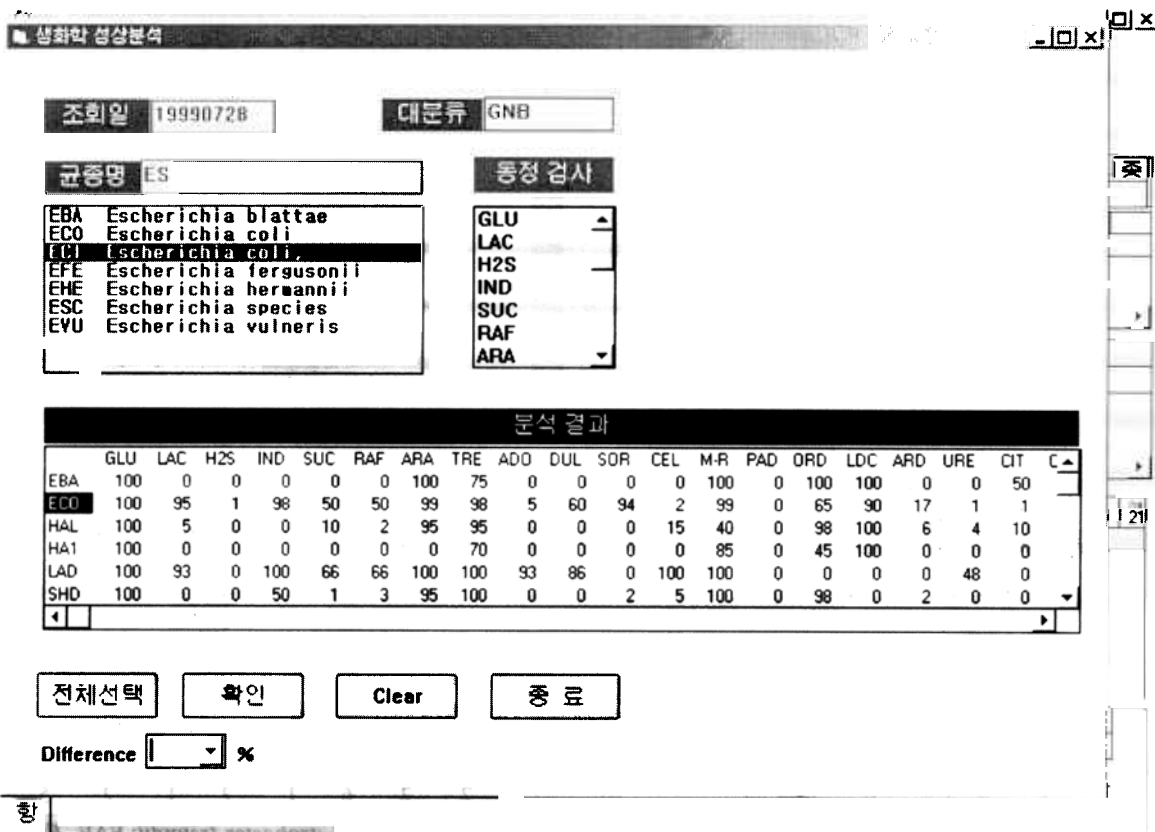


Fig. 3. Screen showing crosstabulation of organisms by biochemical reactions

였다. 두 방법에서 동정확률이 모두 90%이상인 균주는 62균주로서 이 중 61균주(98.4%)가 균종명이 일치하였고 균명이 일치하지 않는 1균주는 API 20E에서 *Klebsiella pneumoniae*였으나 microplate 법에서는 *Klebsiella oxytoca*로 동정되었다(Table 2). Microplate 법과 API 20E 모두에서 %ID가 90%이상인 아닌 31균주 중 균종수준까지는 23균주가 일치하였고 균속수준까지는 28균주가 일치하였으며(Table 3), 93균주를 대상으로 두 방법의 %ID에 따른 동정 일치율은 균종수준까지는 90.3%(84/93)였고, 균속수준까지는 97.8%(91/93)였다(Table 2, Table 3).

Microplate 법과 API 20E에서 동정시험이 같은 12가지 중 한가지 동정 시험만 불일치를 보인 시험과 균수는 urease 7주, LDC 6주, arabinose 4주, sucrose와 citrate가 각각 3주씩이었고 ARD, indole, sorbitol과 PAD는 각각 1주씩이었으며 두 가지 시험이 불일치를 보인 균주는 3균주로서 urease와 arabinose, LDC와 sucrose, LDC와 ARD가 각각 1주씩이었다(Table 4). 두 방법간의 동정 시험별 일치율은 glucose, H₂S 및 ORD 시험은 100%였고, indole, sorbitol 및 PAD는 98.9%였으며 ARD는 97.8%, citrate 96.8%, sucrose 95.7%, arabinose 94.6%, urease와 LDC는 각각 91.4%였다.

고 찰

임상검체에서 분리되는 장내세균은 20-30개의 균종이 전체 분리주의 95%이상을 차지하므로 10개내외의 생화학 시험만으로도 대부분의 장내세균을 동정할 수 있다[1-4]. 그러나 장내세균은 여러 균속과 균종이 계속적으로 추가되며 분류가 바뀌고 균종별 생화학 성상양성률이 달라지게 되므로 정확한 동정을 위해서는 20개이상의 생화학 시험과 동정 프로그램이 필요하다[12].

본 연구에서 microplate 법의 생화학 시험 종목의 선택은 10 tube 법의 동정 결과의 분석 자료[2]를 토대로 하였다. 즉, 10 tube 법에서 판독에 문제점이 있었던 운동성 시험은 동정시험 목록에서 제외하고 indole과 ORD 시험을 개별 검사로 전환하였으며 액체배지를 사용하였던 urease 시험을 고체배지로 바꾸었으며, 감별 동정이 어려운 경우가 있었던 *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Cedecea* 균속의 동정력을 높이기 위하여 sucrose, raffinose, dulcitol과 sorbitol 당분해 시험을 추가하였고, cellibiose 당분해 시험은 *Escherichia*와 *Serratia* 균속의 감별 동정 및 *Escherichia-Shigella*와 *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella* 균속간의 감별을 위

Table 2. Comparison of microplate ID system and API 20E for 62 isolates that likelihoods were equal or greater than 90% in both ID system

		Identification by API 20E																Total	
Microplate	ID system	AHY	CFR	EAE	ECL	ECO	ESA	KOX	KPN	MMM	PMI	PRE	PST	PVU	SAL	SAT	SHD	SMA	
	ACA	1																	1
	CFR		4																4
	EAE			2															2
	ECL				6														6
	ECO					13													13
	ESA						1												1
	KOX							3	1										4
	KPN								9										9
	MMM									1									1
	PMI										2								2
	PRE											2							2
	PST												6						6
	PVU													1					1
	SAL														2				2
	SAT															1			1
	SHD																2		2
	SMA																	5	5
	Total	1	4	2	6	13	1	3	10	1	2	2	6	1	2	1	2		

Abbreviations: ACA, *Aeromonas caviae*; AHY, *Aeromonas hydrophila/caviae*; CFR, *Citrobacter freundii*; EAE, *Enterobacter aerogenes*; ECL, *Enterobacter cloacae*; ECO, *Escherichia coli*; ESA, *Enterobacter sakazakii*; KOX, *Klebsiella oxytoca*; KPN, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*; MMM, *Morganella morganii* subsp. *morganii*; PMI, *Proteus mirabilis*; PRE, *Providencia rettgeri*; PST, *Providencia stuartii*; PVU, *Proteus vulgaris*; SAL, *Salmonella* species; SAT, *Salmonella typhi*; SHD, *Shigella sonnei*; SMA, *Serratia marcescens*.

하여 추가하였으며, methyl red 시험은 *Klebsiella* 균속의 감별을 위하여, oxidase 시험은 *Aeromonas*와 *Plesiomonas*의 동정을 위하여 추가하였다. 또한 microplate 법에 분주할 배지량과 배양조건 및 접종방법을 결정하기 위하여 다음과 같은 예비실험을 시행하였다. 먼저 microplate에 분주하는 배지량을 100 μ L와 250 μ L로 나눈 microplate에 이전의 연구[1]에서 API rapid 32E와 10 tube 법을 동시에 시행하였던 균주들을 접종한 후 당성분과 urease 시험에는 oil을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 2일간 호기성 상태로 배양한 결과, 배지량에 따른 생화학 성상의 차이는 없었으나 배지량이 100 μ L인 경우에는 배지제조기간이 1달이 지날 쯤에는 배지가 말라 갈라지는 현상이 관찰되었으며 당 시험은 oil을 첨가한 경우에 색조가 뚜렷하였으나 48시간 배양후에는 일부 균주에서 양성 반응이 음성으로 변화되었고 urease 시험은 oil을 첨가하는 것이 판독이 용이하였으며 PAD 및 citrate 시험은 10 tube 법의 사면 배지 반응보다 판독이 쉬웠다. 예비시험에서는 glucose와 lactose 발효 시험도 microplate 법으로 시험하였으나 KIA 배지에서의 반응과 일치할 뿐만 아니라 균주를 1

주일간 보관하기 위해서는 KIA 배지가 필요하므로 KIA 배지의 반응을 microplate 법에 포함시켰다. 또한 microplate 배지의 접종 작업량을 줄이기 위하여 한 번에 4개의 well에 동시에 접종할 수 있는 4지 접종침을 고안하여 사용하였다. 이상의 예비실험에 따라 microplate 배지량은 250 μ L로, oil을 첨가하는 시험은 ORD, LDC, ARD 및 urease 시험 및 당분해시험으로, 배양기간은 하룻밤(18-24시간)으로 결정한 후 임상검체 분리주와 보관 균주를 대상으로 본 실험을 시행하였다.

Microplate 법과 API 20E의 %ID가 90%이상인 균주의 비율은 각각 83.9%와 77.4%로서 microplate 법에서 동정확률이 높은 균주가 많았으나 시험 균주의 종류가 다양하지 않아 정확한 비교는 할 수 없었다. Microplate 법에서 *K. oxytoca*였으나 API 20E에서는 *K. pneumoniae*로 동정되었던 균주는 두 방법간의 indole 결과의 차이 때문이었으며 API 20E에서는 *S. liquefaciens*였으나 microplate 법에서 *S. marcescens*였던 2균주는 arabinose 반응 결과의 차이 때문이었다. 이처럼 균종 감별의 열쇠가 되는 생화학 시험 결과의 차이

Table 3. Comparison of microplate ID system and API 20E for the identification of *Enterobacteriaceae* based on likelihoods of less than 90%

Microplate ID system	Identification by API 20E system													Total
	CFR	CIF	EAS	ECL	ECO	KLU	KOX	KPN	PAN	PST	SAL	SFO	SLQ	SMA
CFR	1*													
CIF		1†												
CYO														
EA2			1†											
EAS														
ECL				4*										4
ECO					2†1*	1†								5
KOX														
KPN														
PST														
SAL											5†			5
SFO														
SMA													3†	3†2*
Total	2			5	3						5	1	3	5

* Likelihoods of microplate ID system were less than 90% and Likelihoods of API 20E were equal or greater than 90%.

† Likelihoods of microplate ID system were equal or greater than 90% and Likelihoods of API 20E were less than 90%.

‡ Likelihoods are equally less than 90% in both ID system.

Abbreviations were not used in Table 1: CIF, *Citrobacter farmeri*; EAS, *Enterobacter asburiae*; KLU, *Kluyvera* species; PAN, *Pantoea* species; SFO, *Serratia fonticola*; SLQ, *Serratia liquifaciens*; CYO, *Citrobacter youngae*; EA2, *Enterobacter amnigenus* biogroup 2.

는 동정명이 달라지게 되는 중요한 요인이 되므로 microplate 법에서는 결과 입력과 판독의 오류를 최소화하고 균종의 정확한 동정을 위하여 판독자용 comment file을 구축하였다. Comment file의 구성은 한 두 개의 생화학 시험 결과의 차이로 균종명이 달라질 수 있는 동정 코드(identification code)들에 대하여 시험 결과를 재확인할 수 있는 내용과 동정확률 또는 modal frequency가 낮은 균종들의 감별 동정에 필요한 추가시험 자료로 나누었다(Fig. 2). 본 연구의 microplate 법은 KIA 배지와 SIM 배지를 사용하기 때문에 추가시험없이도 가스 생성과 운동성을 확인할 수 있으므로 실제로는 22개의 동정 시험을 확인할 수 있는 동정법이다. 그러나 SIM 배지에서 H₂S를 과량 생성하는 균종은 운동성을 확인하기가 어려운 단점이 있었다.

본 연구의 microplate 법은 시험방법이 간편하며 장내세균에 대한 동정 정확도가 높고 보관 공간이 적게 드는 장점이 있으나 생배지를 사용하기 때문에 유효기간이 짧고 고체배지에 균주를 접종하기 때문에 halophilic vibrios에 대해서는 시험하기가 어렵고, 하룻밤 배양해야 하므로 신속한 동정을 할 수 없다. 앞으로 배지를 건조시켜 균액을 접종하는 방법으로서의 전환과 동정 결과의 입력 오류를 방지하고 판독의 객관성을 유지하며 동정 업무의 간편함을 위하여 microplate reader로 자동판독후 결과를 전송하는 프로그램의 개발

이 필요할 것으로 생각되었다.

요 약

배 경 : Microplate 동정법의 장내세균 동정 정확도와 임상적 유용성을 평가하기 위하여 microplate 법과 API 20E를 비교하였다.

방 법 : 장내세균 92균주와 *Aeromonas* 1주를 대상으로 microplate 법과 API 20E를 동시에 시행하였다. Microplate 동정법의 생화학 시험 종목과 순서는 KIA 배지의 사면과 고층에서의 산생성과 H₂S 생성 시험, microplate의 indole 생성 시험, sucrose, raffinose, arabinose, trehalose, adonitol, dulcitol, sorbitol 및 cellibiose의 8가지 당발효시험과 methyl-red 시험, phenylalanine deaminase, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase, urease 및 citrate 시험의 16가지와 oxidase 시험을 포함하여 20가지로 구성하였고 균 동정은 동정확률(percent likelihood), modal frequency 및 ID score 법을 이용하였다.

결 과 : 92균주의 장내세균과 1균주의 *Aeromonas*의 microplate 법과 API 20E의 동정확률에 따른 동정일치율은 균종수준까지는 90.3%(84/93)였고, 균속수준까지는 97.8%(91/93)였다.

결 론 : 임상검체에서 분리되는 장내세균의 동정을

Table 4. Thirty species showing discrepancies of biochemical reactions between microplate ID system and API 20E system

Identification results			Biochemical reactions								
ID	%ID	Code No.	URE	LDC	ARA	SUC	CIT	ARD	IND	SOR	PAD
CFR (CFR)	74.6 (99.8)	7633141 (1604573)									
CFR (CFR)	99.6 (99.9)	7632161 (3604773)									
CIF (CIF)	100.0 (87.2)	1736560 (3344573)									
CYO (CFR)	80.4 (52.7)	7433161 (3604552)									
KOX (KOX)	99.8 (97.8)	3776051 (5245773)	—								
SMA (SMA)	99.9 (99.7)	1222411 (5316761)	+ [†]								
SMA (SMA)	57.8 (99.7)	1222511 (5316761)	+								
ECL (ECL)	70.5 (94.3)	1616431 (3304573)									
KOX (KOX)	99.9 (97.9)	3777051 (1254773)									
KPN (KPN)	99.2 (93.9)	3676051 (1214773)									
KPN (KPN)	99.9 (63.1)	3636051 (1215573)									
KPN (KPN)	98.2 (93.9)	3677051 (1214773)									
KPN (KPN)	99.2 (98.1)	3676051 (1215773)									
SMA (SLQ)	99.9 (78.1)	1222411 (5306763)			+						
SMA (SLQ)	99.9 (78.1)	1222411 (5306763)			+						
SMA (SMA)	100.0 (81.3)	1222451 (5316763)			+						
SMA (SMA)	99.9 (81.3)	1222411 (5316763)			+						
PMI (PMI)	100.0 (99.9)	5220741 (0736000)									
SMA (SLQ)	100.0 (78.1)	1262411 (5306763)				—					
ECO (KLU)	91.6 (83.9)	3132510 (5144573)				+					
PVU (PVU)	100.0 (99.9)	5300241 (0476020)									
KOX (KOX)	91.5 (97.8)	3776010 (5245773)					+				
SMA (SMA)	98.7 (93.6)	1262410 (5306561)					+				
ECO (ECO)	90.7 (98.1)	3132130 (5044542)									
KOX (KPN)	99.8 (95.0)	3776051 (5214773)									
ECL (ECL)	86.0 (94.3)	3674521 (3304573)									
MMM (MMM)	100.0 (99.9)	1100540 (0174000)									
SMA (SMA)	99.9 (81.3)	1222411 (5316763)	+		+						
EA2 (EAS)	90.2 (67.7)	1036431 (3305523)				+					
SAL (SAL)	99.9 —	5033671 (0736752)									

* Negative in API 20E system and positive in microplate ID system.

† Positive in API 20E system and negative in microplate ID system.

Parenthesis means the results of API 20E system.

Abbreviations were not used in Table 2 and Table 3: URE, urease; LDC, lysine decarboxylase; ARA, arabinose; SUC, sucrose; CIT, citrate; ARD, arginine decarboxylase; IND, indole; SOR, sorbitol; PAD, phenylalanine deaminase.

위한 microplate 법은 장내세균의 동정 정확도가 API 20E와 유사할 뿐만 아니라 검사소요 비용이 저렴하고 검사방법이 간편한 장점이 있는 동정법으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- 어 영, 손정석, 황규열, 장인호, 윤갑준, 서동민. 장내세균 동정을 위한 10 Tube 법의 평가. 대한임상병리학회지 1998;18:363-71.
- 어 영, 손정석, 황규열, 장인호, 윤갑준, 서동민. 장내세균 분리율과 생화학 성상. 대한임상미생물학회지 1998;1:82-96.
- Lee JV. Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Identification of *Aeromonas* in the routine laboratory. *Experientia* 1987;43:355-7.
- Alabi SA and Odugbemi T. Biochemical characteristics and a simple scheme for the identification of *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides*. *J Trop Med Hyg* 1990;93:166-9.
- Altwegg M, Steigerwalt AG, Altwegg-Bissig R, L thy-

- Hottenstein J, Brenner DJ. *Biochemical identification of Aeromonas genospecies isolated from humans*. *J Clin Microbiol* 1990;28:258-64.
6. Kelly MT and Kain KC. *Biochemical characteristics and plasmids of clinical and environmental Plesiomonas shigelloides*. *Experientia*. 1991;47:439-41.
7. Abbott SL, Cheung WK, Kroske-Bystrom S, Malekzadeh T, Janda JM. *Identification of Aeromonas strains to the genospecies level in the clinical laboratory*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1262-6.
8. Farmer JJ III. *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed., Washington, D.C.: Am Soc Microbiol, 1995:438-49.
9. Janda JM, Abbott SL, Carnahan AM. *Aeromonas and Plesiomonas*. In: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington, D.C.: Am Soc Microbiol, 1995:477-82.
10. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. In: *Enterobacteriaceae. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed. Philadelphia: J.B Lippincott, 1992:130-1.
11. Geiss HK and Geiss M. *Evaluation of a new commercial system for the identification of Enterobacteriaceae and non-fermentative bacteria*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:610-6.
12. Forbes BA, Sahm DF, Weiss AS. In: *Overview of conventional methods for bacterial identification*. *Diagnostic microbiology*. 10th ed. St. Louis: Mosby, 1994:167-87.