

장내세균 동정을 위한 EASY 24 plus, API 20E 및 VITEK System의 비교 평가

이미애, 박향숙, 김선주*, 김의종**

이화여자대학교 의과대학 임상병리학교실, 경상대학교 의과대학 임상병리학교실*,
서울대학교 의과대학 임상병리학교실**

Comparison of EASY 24 Plus, API 20E, and VITEK GNI+ for Identification of *Enterobacteriaceae*

Mi Ae Lee, M.D., Hyang Sook Park, M.T., Sunjoo Kim, M.D.*, and Eui Chong Kim, M.D.**

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University Mokdong Hospital, Seoul, Korea, Department of Clinical Pathology, Gyeongsang National University, Chinju, Korea, and Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea***

Background : Several automated and nonautomated systems have been developed and are commercially available for the identification of gram-negative bacilli. EASY 24E+ kit was recently developed as Korean kit for identification of gram-negative bacilli. So we evaluated the accuracy and clinical utility of EASY 24E+ compared with API 20E and VITEK GNI+.

Methods : The 221 clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, including 17 *C. freundii*, 20 *E. cloacae*, 31 *E. coli*, 6 *E. aerogenes*, 29 *K. pneumoniae*, 3 *K. oxytoca*, 11 *M. morganii*, 13 *P. mirabilis*, 16 *Salmonella spp.*, 20 *S. marcescens*, 9 *Shigella spp.*, 22 *S. sonnei*, 16 *S. typhi*, 8 *Y. pseudotuberculosis* and 10 control strains were identified by API 20E, EASY 24E+, and VITEK GNI+. Discrepant strains were performed repeat identifications and we evaluated overall accuracy.

Results : All of control strains were correctly identified by three systems. The overall correct results at species level and at the genus level for 221 clinical isolates, were 96.8% and 99.1% by the VITEK GNI+, 97.7% and 97.7% by the EASY 24+ and 99.1% and 100% by the API 20E. All of *Salmonella spp.*, *S. typhi* and *Shigella spp.* were correctly identified by all three systems and the discrepant identifications of species were 2 *Y. pseudotuberculosis*, 3 *K. pneumoniae* and 2 *K. oxytoca* by VITEK GNI+, 4 *C. freundii* and 1 *P. mirabilis* by EASY 24+, and 2 *S. marcescens* by API 20E.

Conclusions : All three identification systems are accurate methods for the identification of *Enterobacteriaceae*, and EASY 24+ is comparable with API 20E and VITEK GNI+.

(Korean J Clin Microbiol 2001;4(2):96-101)

Key words : Identification, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, *Shigella*, EASY 24+

서 론

장내세균은 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 균종으로서 임상검체에서 정확한 균 동정이 필요하다. 장내세균 동정방법으로는 과거로부터 전통적인 tube를 이용한 동정방법이 있으나 보다 빠르고 간단하게 동정하기 위해서 여러 가지 상품화된 동정 키트가 개발되어 있는데 이중 API 20E (bioMérieux Vitek, Inc.,

Hazelwood, Mo., USA), micro-ID (Remel, Lenexa KS, USA), Crystal Enteric kit/Nonfermenter (E/NF) system (Becton Dickenson, Inc., Cockeysville, Md., USA) 등이 있으며 VITEK Automicrobic system (VITEK AMS, bioMérieux VITEK, USA)과 같은 자동화된 장비가 도입되어 보다 빠르게 동정이 가능하게 되었다[1-4]. 이들 동정 키트는 모두 외국 제품인데 최근 국내에서 장내세균 동정 키트인 EASY 24E+ (코메드, 한국) 키트가 개발되었다. 이에 저자들은 이를 기존의 동정 키트로 널리 이용되는 API 20E, VITEK GNI+와 비교하여 동정률과 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

표준균주로 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 7002), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Serratia marcescens* (ATCC 8100), *Shigella* spp. subgroup A (ATCC 9752), *Shigella* spp. subgroup B (ATCC 9403), *Shigella* spp. subgroup C (ATCC 9207)와 1999년 6월부터 12월까지 이대목동병원 임상병리과에서 임상검체에서 분리된 166주(*C. freundii* 17주, *E. cloacae* 20주, *E. coli* 31주, *E. aerogenes* 6주, *K. pneumoniae* 29주, *K. oxytoca* 3주, *Morganella morganii* 11주, *P. mirabilis* 13주, *Salmonella* spp. 16주, *S.*

Table 1. Comparison of biochemical tests included in API 20E, EASY 24E+, and VITEK GNI+

Biochemical tests	API 20E	EASY 24E+	VITEK GNI+
Rhamnose	+	+	+
Arabinose	+	-	+
Glucose	+	+	+
Maltose	-	+	+
Mannitol	+	+	+
Lactose	-	+	+
Raffinose	-	+	+
Sorbitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Inositol	+	+	+
Adonitol	-	+	+
Urease	+	+	+
Citrate	+	-	+
Phenylalanine deaminase	+	+	+
H ₂ S	+	+	+
ONPG	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Indole	+	+	-
Nitrate reduction	+	+	-
Acetoin(VP) /Melibiose / Gelatinase/ Amygdalin	+	-	-
Ducitol /Cellebiose /Glucoside / Erythritol / OF	-	+	-
DP 300 /Acetamide /Esculin / Plant indican	-	-	+
/Malonate / Polymyxin B /Xylose / p-Coumaric	-	-	+
Oxidase*	+	+	+

* separately tested and do not included in these kits.

-: biochemical tests are not included in this kit, +: biochemical tests are included in this kit.

marcescens 20주), 경상대학교에서 분주받은 *Shigella* spp. (group B) 9주, *S. sonnei* 22주, *S. typhi* 16주 및 서울대학교에서 분주받은 *Yersinia pseudotuberculosis* 8주의 총 221주의 임상검체에서 분리된 균주를 대상으로 하였다.

2. 방법

-70℃에 보관되어 있던 표준균주 및 임상분리 균주를 혈액한천배지 및 McConkey 한천배지에 2번 계대배양하여 API 20E, EASY 24E+ 및 VITEK GNI+의 세 가지 방법으로 키트 설명서에 따라 접종한 후 동정하였다. API 20E는 20개의 cupule이 들어있는 플라스틱 스티럽으로 접종후 18-24시간에 API 코드북으로 동정하였고, VITEK GNI+ card는 30개의 well로 구성되어있고 1개는 growth control이고 나머지는 생화학 검사 반응 well로 되었는데 이는 3-6시간후에 컴퓨터 데이터베이스에 의해 동정하였으며 사용한 소프트웨어는 R06.01판이었는데 *K. pneumoniae/oxytoca*로 동정된 경우는 spot indole 검사를 추가하여 균종을 동정하였다. EASY 24E+는 24종의 생화학 검사의 well로 구성되어 있는데 접종후 18-24시간에 컴퓨터 데이터베이스 프로그램을 이용하여 동정하였다. 각각의 동정 키트에 포함되어 있는 생화학적 검사는 Table 1과 같다. 동정하여 각 키트 간에

일치하지 않는 균주는 재동정을 실시하여 동정률을 구하였다. 동정 일치율은 3가지 키트중 2가지 이상에서 일치하는 것을 확정 동정명으로 하였고, 이때 불일치한 균종의 생화학적 반응을 검토하였다.

결 과

표준균주 *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *C. freundii* (ATCC 8090), *E. coli* (ATCC 25922), *E. aerogenes* (ATCC 13048), *P. mirabilis* (ATCC 7002), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. marcescens* (ATCC 8100), *Shigella* spp. subgroup A (ATCC 9752), *Shigella* spp. subgroup B (ATCC 9403), *Shigella* spp. subgroup C (ATCC 9207)의 10주는 VITEK GNI+, EASY 24+ 및 API 20E 모두에서 동정에 일치하였다. 221주의 임상균주를 대상으로 한 결과에서 VITEK GNI+는 균종수준에서 214주가 일치하여 96.8%의 일치율을 보였고 균속수준에서 219주가 일치하여 99.1%의 일치율을 보였으며, EASY 24+는 첫 번 동정에서 212주가 일치하여 95.9%의 일치율을 보였으나 재검한 결과 216주가 일치하여 97.7% 일치율을 보였고, API 20E는 첫 번 동정에서 218주가 일치하여 98.2%의 일치율을 보였고 재검한 결과 219주가 일치하여 99.1%의 일치율을 보였고 균속수준에서 100%의 일치율을 보였다. 이를 균종별로 보면

Table 2. Identification of *Enterobacteriaceae* by the VITEK GNI+, EASY 24+, and API 20E

Organisms	No. of tested	No. (%) of correct identification at species level				
		VITEK*	EASY 24+		API 20E	
			on initial test	on repeat test	on initial test	on repeat test
<i>C. freundii</i>	17	17	13	13	17	17
<i>E. cloacae</i>	20	20	19	20	20	20
<i>E. coli</i>	31	31	29	31	31	31
<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	6	6	6
<i>K. pneumoniae</i>	29	26	29	29	29	29
<i>K. oxytoca</i>	3	1	2	3	3	3
<i>M. morgani</i>	11	11	11	11	11	11
<i>P. mirabilis</i>	13	13	12	12	13	13
<i>Salmonella</i> spp.	16	16	16	16	16	16
<i>S. typhi</i>	16	16	16	16	16	16
<i>S. marcescens</i>	20	20	20	20	17	18
<i>Shigella</i> spp.(group B)	9	9	9	9	9	9
<i>S. sonnei</i>	22	22	22	22	22	22
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	8	6	8	8	8	8
Total	221	214(96.8)	212(95.9)	216(97.7)	218(98.6)	219(99.1)

* same as initial and repeat test

Table 3. Strains with discrepant identification results by the VITEK GNI+, EASY 24+, and API 20E in 221 clinical isolates and 10 control strains of *Enterobacteriaceae*

Systems	Organisms	No. of isolates	Incorrect ID	Bionumbers
VITEK GNI+	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	2	unidentified organism	7610214430 7210214430
	<i>K. pneumoniae</i>	3	<i>K. oxytoca</i> *	6274773630 6674773631 7674773630
	<i>K. oxytoca</i>	2	<i>K. pneumoniae</i> *	7674777631 6674773631
	<i>C. freundii</i>	3	<i>Pantoea agglomerans</i>	71574404
	<i>C. freundii</i>	1	<i>A. media</i>	71474435
EASY 24+	<i>P. mirabilis</i>	1	<i>M. morganii</i>	10000616
API 20E	<i>S. marcescens</i>	2	<i>S. liquefaciens</i>	53077563

**K. pneumoniae/oxytoca* cannot be identified at species level by VITEK GNI+ and are separately identified by additional spot indole tests

VITEK GNI+는 *C. freundii* 17주, *E. cloacae* 20주, *E. coli* 31주, *E. aerogenes* 6주, *M. morganii* 11주, *P. mirabilis* 13주, *Salmonella* spp. 16주, *S. marcescens* 20주, *Shigella* spp. 9주, *S. sonnei* 22주, *S. typhi* 16주는 모두 일치하였는데 *K. pneumoniae* 29주 중 3주가 *K. oxytoca*로 동정되었고 *K. oxytoca* 3주 중 2주가 *K. pneumoniae*로 동정되었으며, *Y. pseudotuberculosis* 8주 중 2주가 동정되지 않았다. EASY 24+는 *E. cloacae* 20주, *E. coli* 31주, *E. aerogenes* 6주, *K. pneumoniae* 29주, *K. oxytoca* 3주, *M. morganii* 11주, *Salmonella* spp. 16주, *S. marcescens* 20주, *Shigella* spp. 9주, *S. sonnei* 22주, *S. typhi* 16주 *Y. pseudotuberculosis* 8주는 모두 일치하였는데 *C. freundii* 17주 중 13주는 일치하였고 3주는 *Pantoea agglomerans*로, 1주는 *Aeromonas media*로 동정되었으며 *P. mirabilis* 13주 중 1주가 *M. morganii*로 동정되었다. API 20E는 *C. freundii* 17주, *E. cloacae* 20주, *E. coli* 31주, *E. aerogenes* 6주, *K. pneumoniae* 29주, *K. oxytoca* 3주, *M. morganii* 11주, *P. mirabilis* 13주, *Salmonella* spp. 16주, *Shigella* spp. 9주, *S. sonnei* 22주, *S. typhi* 16주 및 *Y. pseudotuberculosis* 8주 모두가 일치하였는데 *S. marcescens* 20주 중 2주가 *S. liquefaciens*로 동정되었다(Table 2, 3).

고 찰

장내세균 동정방법으로는 과거로부터 전통적인 tube를 이용한 동정방법이 있으나 보다 빠르고 간단

하게 동정하기 위해서 여러 가지 상품화된 동정 키트가 개발되어 있는데, VITEK Automicrobic system (VITEK AMS, bioMerieux VITEK, USA) 및 MicroScan Walkaway (Dade MicroScan Inc., West Sacramento CA, USA)와 같은 자동화된 장비가 도입되어 빠르게 동정이 가능하게 되었다[5]. 최근에 와서는 MicroScan Walkaway나 VITEK 2 System (VITEK AMS, bioMerieux VITEK, USA) 등은 fluorogenic compound나 fluorometric 분석법을 이용하여 2-4시간내에 더욱 빠르게 동정이 가능하여졌고 동정률도 98.4-99.3%이며 균종수준에서 92.5-97.4%로 보고되어 있다[6]. 그러나 이들 동정 키트는 모두 외국 제품인데 최근 국내에서 장내세균 동정 키트인 EASY 24E+ 키트가 개발되어 저자들은 현재 널리 사용되는 장내동정 키트인 API 20E, VITEK GNI+와 비교하여 보았는데 균종수준까지 EASY 24E+ 95.9-97.7%, VITEK GNI+는 96.8%, API 20E 98.6-99.1%로 높은 동정률을 보였으며 균속수준으로 보면 Easy 24E+는 97.7%, VITEK GNI+는 99.1%. API 20E는 100%로 나타났다. 이는 다른 연구자들이[1,2,7,8] API 20E 동정률 94-98.9%로 보고하였고 rapid API 20E system이 95.9% 정확도를 보였고, VITEK 96.5%로 보고한 것과 비슷한 결과이었고 EASY 24E+도 재검시에는 97.7%로 이와 견줄만 하였다.

3가지 동정 키트의 특성에 따라 균종에 따른 동정률이 다른데 VITEK GNI+로는 indole검사가 키트내에 포함되어 있지 않아서 *K. pneumoniae*와 *K. oxytoca*가 구분되지 않는 단점이 있는데 본 연구에서 spot indole 검

사로 이를 구분한 결과 *K. pneumoniae* 29중 3주가 *K. oxytoca*로, *K. oxytoca* 3주중 2주가 *K. pneumoniae*로 동정되어 *Klebsiella* spp. 총 32주중 5주에서 다른 동정 키트와 차이를 보였다. 이는 어 등[9]이 Microplate법과 API 20E법을 비교하였을 때 indole 검사 방법의 차이로 인하여 *K. pneumoniae*와 *K. oxytoca*와 구별이 되지 않았다는 것과 비슷한 결과이었다. VITEK GNI+로는 다른 균종은 모두 동정이 가능하였으나 *Y. pseudotuberculosis* 8주중 2주가 동정되지 못했는데 *Yersinia* spp.는 실온에서 배양후 동정하는 것이 정확한데 VITEK System은 자동화 장비라서 실온 배양이 될 수 없어서 동정이 정확하지 않았던 것으로 생각된다.

EASY 24+는 처음 동정시에는 95.9%의 동정 일치율을 보였으나 재검시 97.7%로 높은 동정 일치율을 보였는데, 균종별로는 *C. freundii* 17주중 13주는 일치하였고 3주는 *Pantoea agglomerans*로, 1주는 *A. media*로 동정되었으며, *P. mirabilis* 13주 중 1주가 *M. morganii*로 동정되었다. 이중 *C. freundii*가 *P. agglomerans*로 동정된 것은 inositol 양성인 균주로서 만약 inositol 음성이라면 EASY 24+ 데이터베이스에서 % ID가 *C. freundii* 60.7%, *P. agglomerans* 31.3%로 동정되는데 esculin 음성 등으로 보아 *C. freundii*인데 EASY 24+에서 잘못 동정된 것으로 생각되고, *C. freundii* 1주가 *A. media*로 동정된 것은 oxidase 음성이고, yellow pigmentation도 없는 것으로 보아 EASY 24+에서 잘못 동정된 것으로 생각되며, 이 균주는 EASY 24+ 데이터베이스에서도 inositol, H₂S, urease, rhamnose, raffinose 등이 일치하지 않는 균주이었다. EASY 24+에서 *P. mirabilis* 1주가 *M. morganii*로 나타난 것은 H₂S음성으로 나온 결과로 인한 것으로 생각되는데 *P. mirabilis*와 *M. morganii*로 감별점은 H₂S 음성 외에 xylose 음성인 것으로 감별되나 Easy 24+ 키트에는 xylose fermentation이 포함되어 있지 않아 확인할 수가 없었던 것으로 생각된다[10].

API 20E는 균종수준에서 99.1%의 높은 동정 일치율을 보였으며 균속수준으로 보면 100% 동정 일치율을 나타내어 세가지 방법중 동정 일치율이 가장 높았는데, 균종별로는 *Serratia* spp.의 균종 동정시 *S. marcescens* 20주중 2주를 *S. liquefaciens*로 동정하였는데 이 균주들은 API 20E에서 % ID가 *S. liquefaciens* 76.1% *S. marcescens* 23.7%로 동정된 균주들었다. 두 균종을 감별하는데 이용된 반응은 arabinose인데[10] API 20E에서는 양성으로 나타나서 *S. liquefaciens*로 동정되었으나 VITEK GNI+에서는 arabinose가 음성으로 나왔고 Easy 24+에서도 *S. marcescens*로 동정되었던 균주이었다. *Serratia* 균종 동정시 나타나는 이와 같은 차이는 어 등[9]이 API 20E와 Microplate 법에서 arabinose 반응의 차이를 보여 균종 동정이 달라졌다고 한 것과 같은 결과이었다. 그러나 *Salmonella* spp., *S. typhi* 및 *Shigella* spp. 등의 중요한 장내세균 및 표준균주 동정

에는 3가지 동정 키트 모두 100% 일치하였다.

결론적으로 3가지 동정 키트 모두 임상분리 균주에서 균종수준에서 96.8-99.1%, 균속수준에서 97.7-100%로 높은 동정 일치율을 보였으며 표준균주나 *Salmonella* spp., *S. typhi* 및 *Shigella* spp. 등의 중요한 장내세균 동정에는 3가지 동정 키트 모두 일치하였으므로 장내세균동정에는 큰 문제 없이 각자의 검사실 여건에 맞는 동정 키트를 사용하면 될 것으로 생각되고 국산 동정 키트인 EASY 24+도 국제적인 장내동정 키트인 API 20E 또는 VITEK GNI+ 등과 비교하여 별 문제가 없는 동정 키트로 생각된다.

요 약

배 경 : 장내세균을 동정하기 위한 많은 자동화된 혹은 일반 동정 키트가 개발되어 상품화되어 있다. 이들 제품은 모두 외국 제품인데 최근 국내에서 EASY 24E+ (코메드, 한국) 키트가 개발되었다. 이에 저자들은 이를 기존의 동정 키트로 널리 이용되는 API 20E, VITEK GNI+ 와 비교하여 정확성 및 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

방 법 : 표준균주 10주와 *C. freundii* 17주, *E. cloacae* 20주, *E. coli* 31주, *E. aerogenes* 6주, *K. pneumoniae* 29주, *K. oxytoca* 3주, *M. morganii* 11주, *P. mirabilis* 13주, *Salmonella* spp. 16주, *S. marcescens* 20주, *Shigella* spp. 9주, *S. sonnei* 22주, *S. typhi* 16주 및 *Y. pseudotuberculosis* 8주의 총 221주의 임상 분리 균주를 대상으로 API 20E, EASY 24E+ 및 VITEK GNI+ 의 세 가지 방법으로 동정하였다. 처음 동정하여 각 키트 간에 일치하지 않는 균주는 재동정을 실시하여 정확성을 평가하였다.

결 과 : 표준균주 10주는 세가지 동정 키트 모두에서 100%일치하였다. 총 221 임상 분리 균주에 대한 균종수준의 동정율은 VITEK GNI+ 96.8%, EASY 24+ 97.7% 및 API 20E 99.1%를 보였고 균속수준의 동정율은 VITEK GNI+ 99.1%, EASY 24+ 97.7% 및 API 20E 100%를 보였다. 균종별로 보면 *Salmonella* spp., *S. typhi* 및 *Shigella* spp.는 세가지 동정 키트에서 모두 일치하였고, VITEK GNI+는 *Y. pseudotuberculosis* 2주 및 *K. pneumoniae/oxytoca* 5주를, EASY 24+는 *C. freundii* 4주와 *P. mirabilis* 1주를, API 20E는 *S. marcescens* 2주를 동정하지 못하였다.

결 론 : 3가지 동정 키트 모두 장내세균에 정확한 동정 방법으로 생각되며, 국산 동정 키트인 EASY 24+도 API 20E 또는 VITEK GNI+와 견줄만한 방법으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Robinson A, McCarter YS, Tetreault J. Comparison of

- Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system, and Vitek Automicrobic system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol* 1995;33:364-70.
2. Overman TL, Plumley D, Overman SB, Goodman NL. Comparison of the API rapid E four-hour system with the API 20E overnight system for the identification of routine clinical isolates of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1985;21:542-5.
 3. Burdash NM, Teti G, West ME, Bannister ER, Manos JP. Evaluation of an automated, computerized system (Automicrobic system) for Enterobacteriaceae identification. *J Clin Microbiol* 1981;13:331-4.
 4. Wauters G, Boel A, Voorn GP, Verhaegen J, Meunier F, Janssens M, et al. Evaluation of a new identification system, crystal enteric/non-fermenter, for gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1995;33:845-9.
 5. Pfaller MA, Sahm D, O' Hara C, Ciaglia C, Yu M, Yamane N, et al. Comparison of the autoSCAN-W/A rapid bacterial identification system and the Vitek AutoMicrobic system for the identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1991;29:1422-8.
 6. Achondo K, Bascomb S, Bobolis J, Chipman A, Connell S, Enscoe G, et al. New improved MicroScan rapid negative identification panel. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 1995:C307.
 7. O' hara CM, Rhoden DL, Miller JM. Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family Enterobacteriaceae: a new look at an old product. *J Clin Microbiol* 1992;30:123-5.
 8. Izard D, Husson MO, Vincent P, Leclerc H, Monget D, Boeufgras JM. Evaluation of the four-hour rapid 20E system for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1984;20:51-4.
 9. 어영, 손정석, 황규열, 장인호, 윤갑준, 서동민. Microplate를 이용한 장내세균동정법. *대한임상미생물학회지*. 1999;2;135-43.
 10. Holt JG, Krieg NR, et al. eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994;175-89.