

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

접수번호 : CM 4-02-10

교 신 저 자 : 이미애

(158-050) 서울시 양천구 목동 911-1
이화대학부속 이대목동병원 임상병리과
Tel : 02) 650-5222 Fax : 02) 654-7948
Email : miae@mm.ewha.ac.kr

장내세균은 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 균종으로서 임상검사실에서 정확한 균 동정이 필요하다. 장내세균 동정방법으로는 과거로부터 전통적인 tube를 이용한 동정방법이 있으나 보다 빠르고 간단하게 동정하기 위해서 여러 가지 상품화된 동정 키트가 개발되어 있는데 이 중 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. Comparsion 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°C에 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 스티립으로 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	VITEK*	No. (%) of correct identification at species level			
			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. morganii</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
EASY 24+	<i>C. freundii</i>	3	<i>Pantoea agglomerans</i>	71574404
	<i>C. freundii</i>	1	<i>A. media</i>	71474435
	<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 견줄만하였다.

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* 29주 중 3주가 *K. oxytoca*로, *K. oxytoca* 3주 중 2주가 *K. pneumoniae*로 동정되어 *Klebsiella* spp. 총 32주 중 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* 8주 중 2주가 동정되지 못했는데 *Yersinia* spp.는 실온에서 배양 후 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* 17주 중 13주는 일치하였고 3주는 *Pantoea agglomerans*로, 1주는 *A. media*로 동정되었으며, *P. mirabilis* 13주 중 1주가 *M. morganii*로 동정되었다. 이 중 *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 H₂S 음성으로 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 세 가지 방법 중 동정 일치율이 가장 높았는데, 균종별로는 *Serratia* spp.의 균종 동정시 *S. marcescens* 20주 중 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

예는 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

概 要 : 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 기준의 동정 키트로 널리 이용되는 API 20E, VITEK GNI+ 와 비교하여 정확성 및 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

方 法 : 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.

结 果 : 표준균주 10주는 세 가지 동정 키트 모두에서 100% 일치하였다. 총 221 임상 분리 균주에 대한 균종 수준의 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 세 가지 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.

結 论 : 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 Automicrobiic 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 (Automicrobiic 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 AutoMicrubic 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, Enscroe 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. *Bergery's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994;175-89.*