

Comparison of the Vitek 2, API 20A, and 16s rRNA Gene Sequencing for the Identification of Anaerobic Bacteria

Gyun Cheol Park¹, Sook Jin Jang^{1,2}, Min Jung Lee², Joong-Ki Kook³, Min Jung Kim³, Young Sook Kim⁴, Nam Woong Yang⁵, Hye Soo Lee^{6,7}, Seong Ho Kang¹, Geon Park¹, Dae Soo Moon¹

¹Department of Laboratory Medicine, ²Research Center for Resistant Cells, Chosun University College of Medicine, ³Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, ⁴Departments of Radiology, Chosun University College of Medicine, ⁵Department of Microbiology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, ⁶Department of Laboratory Medicine, Chonbuk National University Medical School, ⁷Chonbuk National University Hospital Branch of National Culture Collection of Pathogens, Jeonju, Korea

Background: Recently, genotypic identification of anaerobes is emerging as an alternative to the phenotypic method. In this study, we evaluated the performance of Vitek 2, API 20A and 16s rRNA gene sequencing for the identification of anaerobic bacteria.

Methods: A total of 35 anaerobe reference strains were identified using Vitek 2, API 20A and 16s rRNA gene sequencing. We evaluated the performance of three methods on the basis of the accurate identification rates.

Results: The Vitek 2, API 20A and 16s rRNA gene sequencing identified 54.3, 15.4, and 94.3% of test strains correctly at the species level and identified 77.1, 42.3, and 100% at the genus level, respectively.

Results of the McNemar's test showed that there was a significant difference between each of the three identification methods in species level identification (P value < 0.05).

Conclusion: 16s rRNA gene sequencing showed better performance than Vitek 2 or API 20A for anaerobic bacteria. Considering its excellent performance, 16s rRNA gene sequencing may be useful for accurate identification of anaerobic bacteria that cannot be correctly identified by phenotypic methods. (*Ann Clin Microbiol* 2015;18:20-26)

Key Words: Anaerobic bacteria, API 20A, Comparison, Vitek 2, 16s rRNA Gene sequence

INTRODUCTION

무산소성 세균은 사람의 피부나 점막에 정상 무리로 존재하며, 일부는 기회감염을 일으킬 수 있으며 신체 어느 부위이나 감염을 유발할 수 있다. 무산소성 감염으로 인한 균혈증은 국내외 여러 연구에서 높은 사망률을 보여 임상적 중요성이 크다 [1-3]. 대부분의 무산소성 감염은 임상적 특징이 뚜렷하지 않아 정확한 진단이 어려우므로 올바른 동정 방법의 선택이 중요하다. 과거 무산소성 세균의 동정은 주로 표현형적 유사성을 근거로 하는 생화학적 검사 방법이 사용되어왔는데, 동정에 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있다 [4]. 그러므로 무산소성 세균을 보다 신속하고 정확하게 동정하기 위한 대체 검사법의 필요성이 꾸준히 대두되어 왔다. 최근 미생물 동정용 자동화 시

스템 발달과 함께 시간과 비용을 절감하는 다양한 동정 방법들이 개발되어 왔다. 현재 국내병원의 검사실에서는 무산소성 세균 동정에 Vitek 2나 API 20A와 같은 상품화된 표현형 동정 시스템을 널리 사용하고 있다. 지난 수년간 이러한 표현형 동정 시스템의 무산소성 세균 동정에 대한 평가들이 보고되어 왔다 [5-11]. 하지만 표현형 동정 시스템은 database 내에 포함되지 않은 균주들에 대해서는 동정의 정확도가 떨어지는 단점이 있으며 [5,6,12-14], 약한 생화학적 반응을 나타내거나 배양시간이 오래 걸리는 균종의 경우 동정이 어려울 수도 있다. 이러한 표현형적 동정방법의 한계를 극복하고자 최근 통상적인 동정법을 대체하는 분자적 세균 동정법이 병원의 미생물 검사법으로 도입되고 있는 추세이다. 이 중 표적유전자로서 16S rRNA를 사용하여 염기서열 분석을 한 후 세균을 동정하는 16S rRNA

Received 23 December, 2014, Revised 9 January, 2015, Accepted 10 January, 2015

Correspondence: Sook Jin Jang, Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, 365, Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 501-717, Korea. (Tel) 82-62-220-3259, (Fax) 82-62-232-2063, (E-mail) sjbjang@chosun.ac.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

유전자 염기서열 분석법이 널리 사용되고 있다[15]. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법은 통상적인 동정법에 비해 신속하고 정확하여 세균의 계통분석에서 그 중요성이 커지고 있다[12, 16-18]. 하지만 전문적 기술이 필요하고 비용이 상대적으로 많이 소요되어 병원에서 검사 목적으로 사용되는 경우는 제한되어 있다.

지금까지 표현형 동정법과 분자유전학적 동정법의 무산소성 균주 동정 결과에 대한 다양한 보고가 있었지만 Vitek 2와 API 20A, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법의 3가지 동정 결과를 비교한 연구는 흔치 않다. 이에 본 연구에서는 임의로 선정된 무산소성 표준균주 35주를 대상으로 Vitek 2와 API 20A, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법의 3가지 방법으로 동정한 후, 그 결과를 비교하여 각 균 동정법의 유용성과 의의를 평가하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상

우리는 35주의 무산소성 표준균주를 대상으로 Vitek 2, API 20A, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법의 3가지 방법을 이용하여 각각 동정을 시행하였다(Table 1).

2. 방법

1) 균주의 배양: Luria-Bertani (LB) blood agar plate 배지 (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)에 대상균주를 접종한 후 Quick anaero-system (DAS Tech, Gwangju, Korea) [19]을 이용하여 35-37°C에서 48시간 동안 무산소성 환경에서 배양하였다.

2) API 20A를 사용하여 균 동정: 균 농도를 3.0 McFarland 탁도에 맞춘 현탁액을 API kit의 검사항목 기질들에 접종한 후 24-48시간 동안 37°C 무산소성 환경에서 배양하였다. 배양이 완료된 후 나타난 반응을 제조사의 지시사항에 따라 기록하였다. 동정결과는 apiweb (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속한 후 기록한 반응 결과를 입력하여 확인하였다.

3) Vitek 2 system을 사용하여 균 동정: 배양한 균주를 0.45% 생리식염수에 현탁하여 3.0 McFarland의 탁도에 맞춘 후 Anaerobe and Corynebacterium Identification Card (ANC) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)에 주입하여 Vitek 2 장비에서 24시간동안 배양하였다. 결과는 Vitek 2 ANC system software를 사용하여 자동으로 동정하였다.

4) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법으로 균 동정: 세균으로부터 DNA를 추출한 후 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')를 시발체로 사용하여 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭시켰다. PCR 산물은 AccuPrep[®] PCR Purification Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)

을 사용하여 정제하고, pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Madison, WI, USA)을 이용하여 ligation하였다. Ligation 혼합물을 *Escherichia coli* DH5 α 형질전환세포에 도입하여 배양한 재조합 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열분석의 주형으로 사용하였다. 염기서열분석은 Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA)와 ABI PRISM 310 genetic analyzer를 사용하여 수행하였으며 시발체는 ChDC-GEM-F (5'-TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AA-3'), Seq-F1 (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), Seq-R2 (5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'), ChDC-GEM-R (5'-GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC-3')를 이용하였다. 얻어진 염기서열 데이터를 GenBank에 축적된 데이터와 비교하기 위해 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 사용하였다.

5) 동정 결과의 범주 분류: Vitek 2와 API 20A로 무산소성 표준 균주를 동정한 결과가 단일 균종으로 나왔을 때 그 결과가 맞는지 여부에 따라 다음의 4가지 경우, 즉 (1) 종수준에서 정확히 동정된 예, (2) 속수준에서 정확히 동정된 예, (3) 결과가 나오지 않거나 반응이 없어서 동정에 실패한 예, (4) 종과 속이 틀리게 동정된 예 중의 하나로 기록하였다. 동정결과 속명은 맞지만 2종 이상의 종명이 나왔을 때 그 중 정확한 종명이 포함되더라도 속수준에서 동정된 것으로 기록하였다. 그리고 서로 다른 속명에 속하는 2개 이상의 종명이 나왔을 경우 종과 속의 동정이 부정확한 것으로 기록하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석법의 동정 결과는 다음과 같이 분류하였다. (1) 염기서열의 상동성(similarity score)이 99% 이상이면서 정확한 균종명과 일치할 때, 종수준까지 정확하게 동정된 것으로 기록하였다. (2) 염기서열의 상동성이 99% 미만 이면서 97% 이상인 경우 속수준에서 동정된 것으로 기록하였다. 그리고 (3) 염기서열의 상동성이 97%보다 낮은 경우 동정이 틀린 것으로 기록하였다(incorrect identification). (4) 균종명이 제시되지 않는 경우에는 동정이 안된 것으로 기록하였다(no identification).

6) 통계 분석: Vitek 2, API 20A, 그리고 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법으로 얻어진 동정률의 차이가 통계적으로 유의한지 확인하기 위해 SPSS version 18.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 McNemar's test를 시행하였다. 3가지 검사 방법으로 동정된 결과를 종과 속수준에서 정확히 동정되었는지 여부를 매 균주마다 각각 기록한 후 '정확' 또는 '부정확'으로 분류하여 통계분석을 하였다. *P* value가 0.05이하 일 경우, 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 보았다.

RESULTS

Table 2에 Vitek 2와 API 20A 및 16S rRNA 유전자 염기서

Table 1. The results of identification using API 20A, Vitek 2 and 16S rRNA sequencing of 35 anaerobic reference strains

Strain	Species	Vitek 2	API 20A	16S rRNA gene sequencing
ATCC 33384	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
ATCC 35568	<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>A. meyerii/odontolyticus</i>	<i>A. meyeri</i>
CCUG 35333	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.
ATCC 17929	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>A. meyeri/odontolyticus</i>	<i>A. odontolyticus</i>
ATCC 15987	<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>A. meyeri</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinomyces</i> spp.
ATCC 25285	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides distasonis</i> , <i>P. melaninogenica/oralis</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>B. fragilis</i>
KBN06P00386	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	NT	<i>B. fragilis</i>
KBN06P00387	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	NT	<i>B. fragilis</i>
KBN06P00388	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	NT	<i>B. fragilis</i>
KBN06P00389	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	NT	<i>B. fragilis</i>
KBN06P00390	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	NT	<i>B. fragilis</i>
ATCC 8482	<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. vulgatus</i>
ATCC 13124	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>
ATCC 12464	<i>Clostridium septicum</i>	<i>C. septicum</i>	<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	<i>C. septicum</i>
ATCC 3584	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. botulinum/sporogenes</i> , <i>Clostridium bifermentans</i>	<i>C. sporogenes</i>
ATCC 8486	<i>Eubacterium limosum</i>	<i>E. limosum</i>	<i>E. limosum</i> , <i>P. acnes</i>	<i>E. limosum</i>
ATCC 33693	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Fusobacterium varium</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>F. necrophorum/nucleatum</i> , <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	<i>F. periodonticum</i>
ATCC 25286	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>	<i>P. asaccharolytica</i> , <i>F. necrophorum/nucleatum</i>	<i>F. necrophorum</i>
ATCC 25599	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>A. israelii</i>	<i>L. paracasei</i>
CCUG 51858	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	No identification	NT	<i>P. stomatis</i>
ATCC 33277	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	No identification	NT	<i>P. gingivalis</i>
ATCC 29303	<i>Prevotella bivia</i>	<i>P. bivia</i>	<i>P. bivia</i>	<i>P. bivia</i>
ATCC 19188	<i>Prevotella brevis</i>	No identification	<i>Propionibacterium propionicus/avidum</i> , <i>A. israelii</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>Bacteroides ovatus/thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i>	<i>P. brevis</i>
ATCC 33574	<i>Prevotella buccae</i>	<i>P. buccae</i>	<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>P. buccae</i>
ATCC 25611	<i>Prevotella intermedia</i>	No identification	NT	<i>P. intermedia</i>
1109/ChDC KB53	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>P. bivia</i> , <i>Prevotella disiens</i> , <i>P. melaninogenica</i>	<i>P. asaccharolytica</i> , <i>F. necrophorum/nucleatum</i>	<i>P. intermedia</i>
ATCC 15930	<i>Prevotella loescheii</i>	No identification	<i>P. melaninogenica/oralis</i> , <i>B. vulgatus</i>	<i>P. loescheii</i>
ATCC 25845	<i>Prevotella melaninogenica</i>	No identification	<i>P. intermedia/disiens</i>	<i>P. melaninogenica</i>
ATCC 43324	<i>Prevotella oulorum</i>	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. melaninogenica/oralis</i>	<i>P. oulorum</i>
ATCC 19189	<i>Prevotella ruminicola</i>	No identification	<i>P. intermedia/disiens</i>	<i>P. ruminicola</i>
ATCC 6919	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>
KBN06P00391	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>P. acnes</i>	NT	<i>P. acnes</i>
1542/ChDC B715	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>
ATCC 17745	<i>Veillonella Parvula</i>	<i>Veillonella</i> spp.	No identification	<i>V. parvula</i>
1035/ChDC B273	<i>Veillonella Parvula</i>	<i>Veillonella</i> spp.	No identification	<i>V. parvula</i>

Abbreviation: NT, not tested.

Table 2. Performance of Vitek 2, API 20A and 16S rRNA gene sequencing in the identification of 35 anaerobic reference strain*

Performance of identification	Vitek 2		API 20A		16S rRNA gene sequencing	
	No	%	No	%	No	%
Correct identification at the species level	19	(54.3)	4	(15.4)	33	(94.3)
Correct identification at the genus level	27	(77.1)	11	(42.3)	2	(100)
Incorrect identification	1	(2.9)	13	(50.0)	0	(0.0)
No identification	7	(20.0)	2	(7.7)	0	(0.0)
Sum	35	(100)	26	(100)	35	(100)

*Comparison pairs showing statistically significant differences ($P < 0.05$) by McNemar's test: VITEK 2 versus API 20A, VITEK 2 versus 16S rRNA gene sequencing, and API 20A versus 16S rRNA gene sequencing at the genus and species level.

열 분석법을 사용하였을 때 각 동정법의 정확한 동정률을 제시하였다. Vitek 2, API 20A, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법 3가지 방법으로 35주의 표준균주를 각각 동정하였을 때 종수준에서 각각 54.3%, 15.4%, 94.3%가 정확하게 동정되었으며, 속수준에서는 각각 77.1%, 42.3%, 100%가 정확하게 동정되었다. McNemar's test 결과, 종수준과 속수준까지 정확한 동정률을 비교했을 때 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법과 Vitek 2, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법과 API 20A, Vitek 2와 API 20A 동정법들 사이에 유의한 차이가 있었다(P value < 0.05).

DISCUSSION

우리는 무산소성 표준균주 35주를 Vitek 2, API 20A, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법 3가지 방법으로 동정한 후 종수준과 속수준까지의 정확한 동정률을 비교해 보았다. 본 실험 결과 3가지 동정법은 종수준의 동정에 있어서 서로 유의한 차이를 보였다.

Mory 등[7]과 Rennie 등[8]은 Vitek 2에 의한 무산소성 균종의 동정률을 조사해 보았을 때 종수준에서 각각 86.5%와 95%로 정확하게 동정되었다고 하였다. 이는 종수준에서 54.3%가 정확하게 동정된 본 연구보다 우수한 결과이다. 이렇게 큰 차이를 보이는 이유는 그들이 본 연구와 달리 database에 포함되어 있는 균종만을 대상으로 실험한 결과로 생각된다[7,8]. 본 연구와 같이 database에 포함되지 않은 균종도 연구대상에 포함시킨 Lee 등[5], Blairon 등[6]의 연구에서는 종수준에서 각각 60.1%와 51.5%로 정확하게 동정되어 본 연구와 비슷한 결과를 나타냈다. Lee 등[5]의 실험 중 database에 포함된 201개의 균주의 결과만을 보았을 때 90% (181/201)가 종수준에서 정확하게 동정되었다. 실험에 사용된 균주 중 database에 포함되지 않은 균종이 극히 소수(6%)였던 Li 등[11]의 연구에서는 86%가 종수준까지 정확하게 동정되었다. 본 연구에서도 database에 포함된 22개의 균주 중 종수준에서 86.4% (19/22)가 정확하게

동정되어 비교적 높은 동정률을 보였다. 이처럼 종수준까지 정확하게 동정된 비율은 균종이 database에 포함되었는지 여부에 따라 명확한 차이가 있었다. Vitek 2의 정확한 동정률을 균종별로 분류한 Mory 등의 결과들을 비교하였을 때, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*가 종수준까지 비교적 정확하게 (90.5-100%) 동정되었다[5,7,8]. 본 연구에서 Vitek 2 시행 결과 *B. fragilis* 6주와 *C. perfringens* 1주 모두 종수준까지 정확하게 동정되었으며, 그 외 database에 포함된 균종 중 *Actinomyces*속 2주, *Bacteroides vulgatus* 1주, *Clostridium*속 2주, *Eubacterium linosum* 1주, *Fusobacterium necrophorum* 1주, *Propionibacterium acnes* 3주가 모두 정확하게 동정되었다. 반면 database에 포함된 균종 중 *Prevotella*속의 종수준까지의 동정률은 타 균종에 비해 상대적으로 낮았다(Table 1). *P. buccae* 1주, *P. bivia* 1주는 종수준까지 정확하게 동정된 반면, *P. intermedia* 1주는 속수준까지 동정되었으며 *P. melaninogenica* 1주와 *P. intermedia* 1주는 동정에 실패하였다. 이런 현상은 Vitek 2로 동정시 *P. buccae*와 *P. bivia*는 정확하게 동정되었고 *P. melaninogenica* 또는 *P. intermedia*의 정확한 동정률이 타 균종에 비해 낮았던 다른 보고[6,8]와 유사한 결과였다. 하지만 위에 언급된 보고와 달리 *P. bivia*에 대해 상대적으로 낮은 정확도의 동정률을 보인 보고[7]도 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 Vitek 2는 database에 포함된 균종 중 *B. fragilis*, *C. perfringens*를 정확하게 동정하는 편이지만 *prevotella*속에 대한 Vitek 2의 동정률의 명확한 평가를 위해서는 충분한 균주수를 대상으로 한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 무산소성 균주를 API 20A로 동정하였을 때 종수준에서 15.4% (4/26)가 정확하게 동정되었는데, 이는 종수준에서 50%가 정확히 동정된 이전 연구에 비해 낮은 비율이다 [4]. 이전 연구에 비해 본 연구의 동정률이 낮은 이유는 본 실험의 연구대상 균주 중 동정이 비교적 쉬운 *B. fragilis*와 *C. perfringens*의 비율이 낮았고 API 20A kit database에 포함되지 않은 균주가 다수 포함되었기 때문인 것으로 생각된다. 이전 연

구에서 사용된 균종 중 *B. fragilis* 그룹과 *C. perfringens*가 차지하는 비율은 30% 이상이였으나[4,10] 본 연구에서 API 20A의 동정에 사용된 *B. fragilis* 그룹과 *C. perfringens*는 3주(11.5%)에 불과했다. 시험균주 수가 많았던 Summanen의 결과에서는 종수준까지 정확하게 동정된 비율이 *B. fragilis* 그룹과 *Clostridium*속에서 각각 67%, 62%로 상대적으로 높았으며 기타 균종에서는 8%-58.5%로 다양하였다[4]. 소수의 시험균주로 검사했던 Kierzkowska의 결과에서는 *B. fragilis* 8주, *B. uniformis* 1주, *C. perfringens* 1주, *P. acnes* 5주, *P. bivia* 3주 등의 균종에서 모두 종수준까지 동정되었다[10]. 본 연구에서 종수준까지 정확하게 동정된 균주는 *C. perfringens* 1주, *P. bivia* 1주, *P. acnes* 2주로 총 4주였다(Table 1). 이러한 결과들을 종합해볼 때 API 20A는 *B. fragilis* 그룹과 *C. perfringens*와 같이 임상적으로 중요한 무산소성 균주를 비교적 잘 동정하지만 database에 포함되지 않거나 약한 생화학 반응을 나타내는 무산소성 균주들은 정확한 동정이 어려워 추가 검사가 필요할 것으로 보인다. 그리고 database에 포함된 일부 균주는 결과를 단독 균종으로 제시하지 못하고 2종 이상의 균종명을 제시하여 추가 검사 없이도 정확한 동정이 어렵다는 점이 API 20A의 단점으로 드러났다[10]. 본 연구에서 *A. meyeri*와 *A. odontolyticus*는 API 20A로 동정시 결과가 *A. meyerii/A. odontolyticus*로 나타났으며 *C. sporogenes*, *F. necrophorum* 및 *P. intermedia*는 각각 *C. botulinum/C. sporogene*, *F. necrophorum/F. nucleatum*, *P. intermedia/P. disiens*를 포함한 2개 이상의 균종으로 제시된 것이 이에 해당하는 결과이다. 이 중 *A. meyerii*, *C. sporogenes*, *F. necrophorum*는 본 연구에서 Vitek 2로 동정하였을 때 종수준까지 정확하게 동정되었으며 *A. odontolyticus*와 *P. intermedia*는 속수준까지 동정되었다. 이처럼 특정 균주는 Vitek 2에서 단독 균주로 정확하게 동정되지만, API 20A에서는 database의 한 계로 속수준까지 명확하게 동정되지 않아 Vitek 2가 API 20A보다 종수준까지의 동정률이 높은 것으로 생각된다.

본 연구에서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법 결과 종수준에서 94.3% (33/35), 속수준에서 100% (35/35)가 동정되었다. 표현형 검사 결과와 비교했을 때 Vitek 2와 API 20A에서 부정확하게 동정된 균종들은 *A. viscosus*와 *A. naeslundii*를 제외하고 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법에서 모두 정확하게 동정되었다. *A. naeslundii*와 *A. viscosus*는 염기서열 데이터가 99% 미만의 상동성(각각 98.3%, 98.7%)을 보여 종수준까지 동정되었다.

본 연구결과를 종합해보면 무산소성 균주의 동정에 있어서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법이 표현형 검사방법보다 더 정확한 결과를 나타냈다. 이는 무산소성 균주의 동정에서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법이 표현형 동정법보다 더 정확한 동정 결과를 보인 이전 연구와 비슷한 결과이다[7,12,13,20]. 표현형 동정 시스템은 database가 임상에서 분리될 가능성이

높은 균종으로 구성되어 있어 database에 포함되지 않은 균종의 동정에 제한이 있을 수 있다. Vitek 2는 database내 균종에 대한 동정률이 높은 편이어서 이에 대한 동정 결과를 신뢰할 수 있는 반면 API 20A는 앞서 언급한 database의 단점 때문에 단독 실험으로 종수준까지의 정확한 동정이 어려운 경우가 상대적으로 더 많을 것으로 보인다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법은 지속적으로 개정되는 방대한 염기서열정보를 제공하는 database를 사용하여 제한된 database를 사용하는 표현형 동정법에 비해 더 정확한 균의 동정이 가능하다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 공공 database는 GenBank이며, 그 외에도 EzTaxon, Ribosomal Differentiaon of Medical Microorganisms (RIDOM) 등의 databas가 널리 사용되고 있다. 하지만 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법에서도 다음과 같은 몇 가지 단점들이 있다. 먼저 16S rRNA 유전자염기서열 분석 결과에 대하여 공통된 종과 속의 해석 기준이 확립되어 있지 않아[12] 연구에 적용된 기준에 따라 서로 다른 동정결과가 나타날 수 있다. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 발표한 지침에서는 염기서열 분석 결과 검사 대상 무산소성 세균의 염기서열 상동성이 99% 이상이면서 다른 종과의 차이가 >0.8%인 경우 속과 종이 모두 동정된 것으로 판독하고, 99% 미만이면서 97% 이상인 경우 속 수준에서 동정된 것으로 판독하도록 권장하고 있다[21]. 16S rRNA 유전자염기서열 분석의 다른 문제점은 염기서열 해석에 사용되는 database나 프로그램에 따라 동일한 염기서열이라도 서로 다른 동정 결과를 나타낼 수 있다는 것이다[12,22]. 이는 database에 따라 포함된 염기서열의 종류, 정확도, 데이터 수집 방식 및 갱신 시기 등의 차이가 있기 때문이다. GenBank, EzTaxon, BIBI[22] 및 RIDOM, MicroSeq[23]등의 database를 사용하여 균주의 염기서열을 분석한 연구에서 일부 균주는 사용한 database에 따라 상이한 상동성 차이를 보였으며, 특정 database에서 종수준까지 동정되지 못한 경우 다른 database로 사용하여 분석하였을 때 종수준까지 동정된 예가 보고되었다. 그러므로 서로 유사한 계통성 때문에 구분이 어렵거나 새롭게 명명된 균종을 동정하는 경우, 두 가지 이상의 database를 활용하여 비교 분석하는 것이 정확한 동정에 도움이 될 것으로 보인다[22].

몇 가지 개선사항이 필요함에도 불구하고 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 무산소성 균의 정확한 동정 측면에서 Vitek 2, API 20A와 같은 표현형 동정방법보다 더 유용할 것으로 생각된다. 하지만 상대적으로 많은 비용이 소요되기 때문에 현실적으로는 표현형 동정법에 대해 보완적인 방법으로 사용되고 있다. 최근 분자 유전 동정 방법의 비약적인 발전으로 검사에 요구되는 전문적 기술과 비용이 점차 줄어들고 있어 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정은 앞으로 늘어날 것으로 예상되고 있다.

본 연구에서 무산소성 세균 동정 결과를 종합해 본 결과 16S

rRNA 유전자 염기서열 분석은 높은 정확도의 동정률을 보이며, 표현형 동정방법으로 동정되지 않는 균주를 비교적 정확하게 동정하였다. 이 같은 결과를 볼 때 표현형 동정방법으로 정확한 동정이 어렵거나 새로운 형질과 유전형을 가지는 균종을 동정 해야 할 경우 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법이 매우 유용할 것으로 보인다.

ACKNOWLEDGMENTS

이 논문은 2012년도 조선대학교병원 선택진료 학술연구비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Park Y, Lee Y, Kim M, Choi JY, Yong D, Jeong SH, et al. Recent trends of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens and clinical characteristics of anaerobic bacteremia. *Infect Chemother* 2009;41:216-23.
- Wilson JR and Limaye AP. Risk factors for mortality in patients with anaerobic bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:310-6.
- Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis* 2007;44:895-900.
- Summanen P and Jousimies-Somer H. Comparative evaluation of RapID ANA and API 20 A for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:771-5.
- Lee EH, Degener JE, Welling GW, Veloo AC. Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 2011;49:1745-9.
- Blairon L, Maza ML, Wybo I, Piérard D, Dediste A, Vandenberg O. Vitek 2 ANC card versus BBL Crystal Anaerobe and RapID ANA II for identification of clinical anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2010;16:355-61.
- Mory F, Alauzet C, Matuszeswski C, Riegel P, Lozniewski A. Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 2009;47:1923-6.
- Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and Corynebacterium identification card. *J Clin Microbiol* 2008;46:2646-51.
- Schreckenberger PC, Celig DM, Janda WM. Clinical evaluation of the Vitek ANI card for identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1988;26:225-30.
- Kierzkowska M, Majewska A, Kuthan RT, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk G. A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level. *J Microbiol Methods* 2013;92:209-12.
- Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis* 2014;6:517-23.
- Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol* 2003;41:1363-9.
- Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 2005;43:6123-5.
- Downes J, King A, Hardie J, Phillips I. Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:319-26.
- Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:840-62, table of contents.
- Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Søgaard P, Justesen T. 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2010;48:946-8.
- Song Y, Liu C, Bolanos M, Lee J, McTeague M, Finegold SM. Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant *Bacteroides* species. *J Clin Microbiol* 2005;43:1531-7.
- Lau SK, Woo PC, Fung AM, Chan KM, Woo GK, Yuen KY. Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol* 2004;53:1247-53.
- Yang NW, Kim JM, Choi GJ, Jang SJ. Development and evaluation of the quick anaero-system-a new disposable anaerobic culture system. *Korean J Lab Med* 2010;30:133-7.
- Simmon KE, Mirrett S, Reller LB, Petti CA. Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2008;46:1596-601.
- CLSI. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing. CLSI document MM18-A. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- Park KS, Ki CS, Kang CI, Kim YJ, Chung DR, Peck KR, et al. Evaluation of the GenBank, EzTaxon, and BIBI services for molecular identification of clinical blood culture isolates that were unidentifiable or misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 2012;50:1792-5.
- Mellmann A, Cloud JL, Andrees S, Blackwood K, Carroll KC, Kabani A, et al. Evaluation of RIDOM, MicroSeq, and Genbank services in the molecular identification of *Nocardia* species. *Int J Med Microbiol* 2003;293:359-70.

=국문초록=

무산소성 세균 동정을 위한 Vitek 2와 API 20A, 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법의 비교

조선대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ²내성 세포연구센터, ³조선대학교 치과대학 구강생화학교실, ⁴조선대학교 의과대학 영상의학교실, ⁵조선대학교 의과대학 미생물학교실, ⁶전북대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실, ⁷전북대학교병원 병원체자원은행

박균철¹, 장숙진^{1,2}, 이민정², 국중기³, 김민정³, 김영숙⁴, 양남웅⁵, 이혜수^{6,7}, 강성호¹, 박 건¹, 문대수¹

배경: 최근 무산소성 균주를 정확하고 빠르게 동정하기 위해 기존의 표현형 검사방법을 대체하는 유전자형 검사방법의 사용이 증가하는 추세이다. 본 연구에서는 Vitek 2, API 20A와 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법의 무산소성 균주에 대한 동정결과를 평가해보았다.

방법: Vitek 2, API 20A, 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법을 사용하여 무산소성 표준균주 35주를 동정하였다. 3가지 검사법의 정확한 동정률을 비교하여 각 검사법의 동정능을 평가하였다.

결과: Vitek 2, API 20A, 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법은 종수준에서 각각 54.3%, 15.4%, 94.3%를 정확하게 동정하였으며, 속수준에서 77.1%, 42.3%, 100%를 정확하게 동정하였다. McNemar's test 결과, 속수준에서의 동정결과에서 3가지 검사법 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(*P* value < 0.05).

결론: 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법은 무산소성 세균의 동정에 대하여 Vitek 2, API 20A보다 더 정확한 동정결과를 나타냈다. 표현형적 동정 시스템으로 정확한 무산소성 세균 동정이 어려운 경우 16s rRNA 유전자 염기서열 분석법이 정확한 동정에 도움이 될 것으로 보인다. [Ann Clin Microbiol 2015;18:20-26]

교신저자 : 장숙진, 501-717, 광주시 동구 필문대로 365
조선대학교병원 진단검사의학과
Tel: 062-220-3259, Fax: 062-232-2063
E-mail: sjbjang@chosun.ac.kr