

원저

Lab Med Online

Vol. 1, No. 2: 105-109, April 2011

DOI 10.3343/lmo.2011.1.2.7

임상미생물학 

체액 및 요검체 접종을 위한 자동 접종장비 PREVI Isola®의 유용성 평가

Evaluation of an Automated Instrument, PREVI Isola® for Inoculation of Body Fluids and Urine Samples onto Agar Plates

김윤정¹ · 윤서영¹ · 손영숙^{1,2} · 이양순^{1,2} · 정혜선^{1,2} · 이운형¹ · 용동은^{1,2} · 정석훈^{1,2} · 이경원^{1,2} · 정윤섭^{1,2}Yoonjung Kim¹, Seoyoung Yoon¹, Young Sook Sohn^{1,2}, Yangsoon Lee^{1,2}, Hae-Sun Chung^{1,2}, Woonhyong Lee¹, Dongeun Yong^{1,2}, Seok Hoon Jeong^{1,2}, Kyungwon Lee^{1,2}, Yunsop Chong^{1,2}연세대학교 의과대학 진단검사의학과¹, 연세대학교 의과대학 세균내성연구소²Department of Laboratory Medicine¹, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Research Institute of Bacterial Resistance², Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: In most clinical microbiology laboratories, inoculation of specimens on plates is performed manually and is a time-consuming process. The efficiency of this process can be improved by using an automated instrument. Currently, several automated instruments have been introduced for inoculation of samples. In this study, we have evaluated an automated instrument, PREVI Isola® (Biomérieux, France), used for inoculation of body fluids and urine specimens.

Methods: Both manual and automated instrument methods were used to inoculate 74 body fluid and 204 urine samples. Precision was evaluated by testing 3 types of urine samples (A, 6×10^3 colony-forming units (CFU)/mL; B, 3×10^4 CFU/mL; and C, $>10^6$ CFU/mL) in replicates of 20. Results of the 2 methods were compared by counting the isolated colonies on agar plates after incubation. The time required for both methods was also compared.

Results: The coefficient of variation (CV) of samples A, B, and C examined using the automated instrument method was 176.1%, 18.1%, and 12.6%, respectively. The sensitivity and specificity of testing body fluid samples were 77% and 100%, respectively, and those of urine samples were 87% each. The time required for testing 15 body fluid specimens and that for inoculation of each specimen was 9.7 min shorter using PREVI Isola® than using the manual method.

Conclusions: The results of body fluid and urine culture by inoculation using the automated instrument, PREVI Isola®, showed relative good agreement with those obtained using the manual method. The use of PREVI Isola® would be expected to reduce the time and labor involved in inoculating various kinds of specimens.

Key Words: Microbiological technique, Laboratory automation, Body fluids, Urine

서론

Corresponding author: Dongeun Yong

Department of Laboratory Medicine, Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-2442; Fax: +82-2-364-1583
E-mail: deyoung@yuhs.ac

Received: August 9, 2010

Revision received: September 13, 2010

Accepted: September 20, 2010

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2011, Laboratory Medicine Online

© 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.

최근 진단검사의학과에서는 업무효율의 증대가 요구되고 있고, 이를 위한 한가지 방법으로 검사업무 자동화가 진행되고 있다. 전통적으로 수기법에 의존도가 높은 임상미생물 검사실에서도 부분적이기는 하나 혈액 배양, 균종 동정 및 항균제 감수성 시험 등에서 자동화된 장비 이용이 점차 늘어나고 있다[1].

미생물검사실 업무 중 검체 접종은 배양 성적을 좌우하므로 매우 중요한 업무이다. 그러나, 검체 접종은 업무의 특성상 수기법으로 시행되어 왔고 이에 많은 인력과 시간이 요구된다. 이를 개선하기 위해 검체 자동 접종장비가 개발되어 소개되고 있는데 Inoculab instrument (Dynacon Inc., Mississauga, Ontario, Canada),

Walk Away Specimen Processor (Copan Diagnostic, Inc., Murrieta, CA, USA)와 PREVI Isola® (Biomérieux, Marcy-l’Etoile, France) 등이 있다[2, 3]. 이들 중 2009년 최초로 국내에 소개된 검체 자동화 접종장비인 PREVI Isola® (Biomérieux)의 유용성을 체액 및 요검체에서 평가하였다.

재료 및 방법

1. 검체

2009년 7월 임상미생물검사실에 배양 의뢰된 체액 및 요검체 중 임의로 각각 74검체와 204검체를 선택하였다.

2. 검체 접종: 수기법 및 자동화 장비법

체액검체는 0.01 mL 백금으로 평판배지의 1/4 구역에 접종한 후 평판의 나머지에 획선하였다. 요검체는 0.001 mL 백금이를 요의 수면 바로 밑까지 수직으로 담근 후, 요가 채워진 것을 확인하고 배지의 중앙에 한 줄로 긋고, 이어서 이 줄에 직각이 되게 적절한 간격으로 획선하였다[4]. 검체 접종은 혈액 한천과 MacConkey 한천평판배지에 시행 후 35°C, 5% CO₂ 배양기에 최소 18시간 배양하였다[5].

자동화 장비 PREVI Isola® (Biomérieux)는 장비회사의 지침서에 따라서 운용하였다. 즉, 일회용 tip을 이용하여 체액 또는 요검체 10 µL를 혈액한천과 MacConkey 한천평판에 자동으로 분주 후 접종기구(applicator)를 사용하여 50 rpm의 속도로 원형 회전하는 한천배지에 획선하였다. 접종한 배지는 모두 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 최소 18시간 배양하였다.

3. 균집락 수 산출

그람양성 균주는 혈액한천 배지, 그람음성 균주는 MacConkey 한천배지에서 증식된 독립된 균집락을 계수하였다.

수기로 접종한 체액검체는 균집락이 자라난 범위가 셋째 구역 이상이면 다수(many), 둘째 구역까지면 중등도(some), 첫째 구역은 소수(few), 균집락이 없는 경우 ‘No growth’로 표시하였다. 수기로 접종된 요검체는 균집락의 수를 세고, 그 수에다 1,000을 곱하여 요 1 mL당의 세균수로 하였고 균 증식이 관찰되지 않은 경우를 ‘<10³ CFU/mL’로 표시하였다[5].

자동화 장비로 접종한 배지의 ‘inner zone’은 균집락의 밀도가 높아 균종 동정 및 항균제감수성시험을 위한 독립된 균집락을 얻기가 어려웠다. 따라서 배지를 4사분면(Q₁-Q₄)을 inner와 outer zone으로 나누어 총 8개로 구분하고 각 구역에서 독립된 균집락을 계수하였다(Fig. 1).

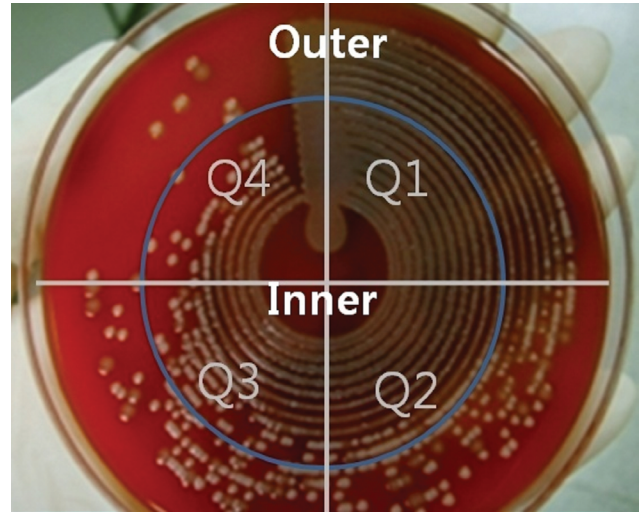


Fig. 1. The colony morphology on plate by PREVI Isola®. The agar plate is divided in 8 sections (quadrant 1–quadrant 4 and outer/inner zone).

4. 정밀도 평가

요검체 중 A 검체(6×10³ CFU/mL), B 검체(3×10⁴ CFU/mL)와 C 검체(>10⁶ CFU/mL)를 임의로 선택하였다. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 지침[6]에 따라 자동화 접종 장비 이용하여 각각 20회씩 반복하여 혈액한천 평판배지와 MacConkey 한천 평판배지에 접종하였다. 접종된 배지는 35°C, 5% CO₂ 배양기에 최소 18시간 배양하였다. 배지 전체의 독립된 집락을 계수하였고 한 사분면에 100개 이상의 집락이 증식되었을 때는 ‘100’으로 산정하여 독립된 균집락의 수를 산출하였다. 이를 기준으로 표준편차와 변이계수를 산출하였다.

5. 수기법과 자동화 장비법의 비교

체액과 요검체는 산정된 전체 배지의 균집락 수를 기준으로 비교하였다. 체액검체에서 수기법과 자동화 장비법의 양성 기준은 접종한 배지에서 하나 이상의 균집락을 보이는 것으로 각각 정하였다. 요검체는 Glasson 등[3]의 방법을 적용하였다. 즉, 자동화 장비법에서 배지의 제3사분면에 증식된 균집락 수가 30 이상인 경우는 양성으로, 수기법에서는 병원균 여부 판단 기준인 10⁵ CFU/mL [7] 이상은 양성, 10⁵ CFU/mL 미만은 음성으로 두 방법을 비교 평가하였다[8].

6. 검체 접종 소요시간

임의로 선택한 요 180검체, 체액 40검체를 대상으로 하였다. 검체의 준비로부터 접종된 배지를 배양기에 넣을 때까지의 소요시간을 각 방법 간에 비교하였다.

결 과

1. 정밀도

자동화 장비법에서 A검체의 평균 집락수와 표준편차는 각각 0.25×10^3 CFU/mL과 0.4이었고 변이계수는 176.1%이다(Table 1). B검체와 C검체에서의 평균과 표준편차는 각각 94.3×10^3 CFU/mL, 17.1과 318×10^3 CFU/mL, 38.9이었고, 변이계수는 각각 18.1%과 12.6%이었다.

2. 수기법과 자동화 장비법의 비교 평가

체액을 수기법으로 접종한 74검체 중 63검체에서 균이 증식되지 않았고, 11검체에서만 13균주가 증식하였다(Table 2). 자동화 장비법에서는 74검체 중 66검체에서 균이 증식되지 않았고 8검체에서 10균주가 증식되었다. 자동화 장비법에서 세균이 증식된 경우는 모두 수기법에서도 균집락이 관찰되었다. 그러나 수기법에서의 균집락 증식 정도가 'Few'이었던 3개 검체에서 자동화 장비법으로는 세균이 배양되지 않았다. 또한, 수기법에서 'Many'로 집락이 형성된 4검체 중 한 개가 자동화 장비법의 outer zone에서는 균증식이 없었다. 양성 기준은 접종한 배지에서 하나 이상의 균집락을 보이는 것으로 두 방법에 각각 적용하였다. 수기법을 기준으로 하였을 때 자동화 방법의 민감도와 특이도는 각각 77%와 100%이었고 일치도는 96%이었다.

요검체 204개 중 64검체에서 수기법에서 세균이 증식되지 않았고, 103개에서는 한 가지 균집락, 35개에서는 두 가지 균집락, 그리고 2개에서는 세 가지 균집락이 증식되었다. 자동화 방법으로 접종한 검체 역시 'No growth'이었던 검체 수와 자라난 균집락의 수

는 수기법과 동일하게 관찰되었다. 수기법에서 균집락 수가 100개 미만인 검체는 자동화 장비법에서 대부분 Q2-3의 outer zone에서 독립된 균집락을 얻을 수 있었다. 수기법을 기준으로 하였을 때 Glasson 등[3]의 방법을 적용하여 비교 평가한 자동화 장비법의 민감도와 특이도는 각각 87%이었고 일치도는 90%이었다(Table 3).

3. 검체처리 소요시간

요 180검체, 체액 40검체 처리시 수기법에서 총 2시간 40분이, 자동화 장비법에서 2시간 15분이 각각 소요되었다. 15검체당 소요 시간을 비교한 결과, 수기법으로는 요검체와 체액검체 접종에 각각 10분과 15.4분이 소요되었고 자동화 장비법으로는 10분과 5.7분이 소요되었다. 본 연구에서는 요검체 처리 속도는 자동화 장비법과 수기법에서 동일하게 나타났지만 자동화 장비법로 체액검체 접종 시 수기법에 비해 63%의 시간이 절약되었다(Table 4).

고 찰

PREVI Isola® (Biomérieux)는 액상 미생물 검체를 한천 배지에 자동으로 접종하는 장비이다. 최대 144개의 검체와 150개의 한천 배지를 장착할 수 있고, 시간당 180개의 배지에 검체를 한천배지에 접종할 수 있다. 접종 시 일회용 tip과 일회용 접종기구를 사용하여 일정한 양의 검체를 분주 및 접종하는 과정을 진행한다.

본 연구에서 시행한 정밀도 평가에서 균 집락이 적게 증식된 A검체에서는 평균 균집락수가 적었으므로 변이계수가 176.1%로 높게 나타났다. 그러나, 평균 균집락수가 많은 B검체(3×10^4 CFU/mL)와 C검체($>10^6$ CFU/mL)에서는 각각 변이계수가 18.1%과 12.6%로

Table 1. Precision of colony count on plates prepared with PREVI Isola®

Sample	Mean ($\times 10^3$ CFU/mL)	SD	CV (%)
A	0.25	0.4	176.1
B	94.3	17.1	18.1
C	318.0	38.9	12.6

Abbreviation: CFU, colony-forming units.

Table 2. Comparison of PREVI Isola® with manual body fluid counts

Bacterial counts by the manual method	No. of samples/isolate	No. of isolate (inner/outer) prepared by PREVI Isola®				
		No growth	Q1 ^a	Q2 ^b	Q3 ^c	Q4 ^d
No growth	63	63	0/0	0/0	0/0	0/0
Few	8	3/3	4/5	1/0	0/0	0/0
Some	1	0/0	0/0	0/1	0/0	1/0
Many	4	0/1	0/0	0/0	0/1	4/2

a-d: quadrants 1-4.

Table 3. Comparison of PREVI Isola® with manual urine counts

Colony counts (CFU/mL) by the manual method	No. of isolates	No. of samples with > 30 colonies in Q3 of plates prepared by PREVI Isola®
10^3 to 10^4	39	1 (2.6%)
10^4 to 10^5	66	13 (19.7%)
$> 10^5$	74	64 (86.5%)

Cut off was $> 10^5$ colonies in manual method and > 30 colonies in Q3 in PREVI Isola® preparation. Sensitivity (87%, 64 positive samples using PREVI-Isola® divided by 74 positive samples using manual method) and specificity (87%, 91 negative samples using PREVI-Isola® divided by 105 negative samples using manual method) were calculated.

Abbreviation: CFU, colony-forming units.

Table 4. Spending time measurement for both methods from inoculation to incubation

Specimen	Spending time (minutes) for 15 samples:		Reduced working time (%)
	Manual	PREVI-Isola®	
Urine	10.0	10.0	0
Body fluid	15.4	5.7	63

평가되었다. 수기법에서 소수의 집락이 형성된 3개의 채액검체에 서 자동화 장비법으로 세균이 배양되지 않았다(Table 2). 이는 점도가 높은 검체인 경우 검체 내의 균분포가 균일하지 않을 수 있기 때문인 것으로 판단하였다. 그러므로 세균수가 적거나 점도가 높은 관절액과 척수액 등의 검체는 위음성 결과를 주의해야 할 것으로 사료된다. 또한 수기법에서 다수의 집락이 형성되었지만 자동화 장비법으로 inner zone에만 세균이 증식된 한 개의 검체의 경우는 검체 내 균의 분포가 고르지 않았기 때문인 것으로 판단하였다. 수기법으로 접종 시에는 배지의 1구역에 검체를 균일하게 퍼져 된다. 이러한 균질화 조작이 본 자동화 장비법에서 부족한 부분으로 판단하였다. 증식된 균주가 배지 위에 고르게 분포하지 않는 경우 균종 동정 및 항균제 감수성 시험을 위한 독립된 집락을 얻기가 어려우므로 재 접종을 해야 하는 번거로움이 있을 수 있다.

자동화 장비법에 의한 검체 접종시 적은 수의 세균이 포함된 검체인 경우 50 rpm 이하로, 많은 수의 세균을 포함한 검체는 50-100 rpm 사이의 속도로 검체를 회전하면 보다 양질의 독립된 균집락을 얻을 수 있다고 하였다[3]. 그러나 본 시험 장비는 배지 회전 속도를 조절할 수 없도록 고정되어 있었다. 따라서 본 연구에서는 제조회사에서 권장에 따라서 분당 회전 수를 50 rpm으로 고정하여 평가를 시행하였다. 실제 임상미생물 검사실에서 운영되는 경우, 검체의 점도와 접종량에 따른 배지 회전속도의 재설정이 필요할 것으로 사료된다.

또한, Glasson 등[3]의 보고에서는 수기법과 비교 시 자동화 장비법에서 99%의 민감도와 99.7%의 특이도로 예측할 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 민감도와 특이도는 각각 87%를 보였다. 이와 같이 민감도와 특이도가 상대적으로 낮았던 원인은 본 연구에서 사용한 자가제조 한천배지의 수평에 원인이 있었던 것으로 판단하였다. 본 자동화 장비법은 직선으로 고안된 접종기구를 사용하기 때문에 한천배지의 수평 정도가 독립된 집락 형성에 큰 영향을 줄 수 있음을 경험하였다.

PREVI Isola® (BioMerieux)는 검체 분주 시 일회용 tip을 사용하여 검체 간의 오염이 없으므로 잔효오염에 대한 평가는 시행하지 않았다.

본 자동화 장비법 연구는 장액성 검체인 채액과 요검체만을 대상으로 하였으나, 그 외에도 객담, 변검체 등의 접종이 가능하다. 그러나 이러한 점액성 혹은 고형 검체는 자동화 장비에 장착 전에 희석 혹은 액상화가 필요하다. 이 과정은 수기로 시행되어야 하기에 번거롭고 시간이 소요된다[9]. 따라서 본 연구에서는 이에 대한 비교는 제외하였다. 또한 이들 점액성 혹은 고형 검체에서의 접종 방법 비교를 위해서는 특정세균의 증식에 영향을 주지 않는 희석액 선택과 희석 비율에 대한 고려가 선행되어야 할 것이다.

수기법과 자동화 장비법으로 검체 접종시의 건수당 소요시간을

비교해 본 결과, 요 15검체, 채액 15검체 접종을 위하여 수기법으로는 각각 10분과 15.4분이 소요되었고 자동화 장비법으로는 각각 10분과 5.7분이 소요되었다. 본 연구에서는 요검체 처리속도는 자동화 장비법과 수기법에서 동일하게 나타났지만 자동화 장비법로 채액 검체 접종 시 수기법에 비해 63%의 시간의 절약되었다. 이는 다량의 다양한 종류의 임상 검체를 접종하는 경우, 자동화 장비를 사용함으로써 시간절약과 오류감소의 효과가 있을 것으로 예상하였다[10].

요 약

배경: 검사실의 업무 효율 향상을 위해 검사업무 자동화가 도입되고 있으며, 최근 임상미생물 검사실에서도 전통적으로 수기법에 의존하던 검체 접종 업무를 자동으로 수행하는 PREVI Isola® (BioMerieux, France)가 최근 소개되었다. 이에 채액 및 요검체 접종시 실무에서의 본 자동화 장비의 유용성을 평가하였다.

방법: 2009년 7월 임상미생물검사실에 배양 의뢰된 채액 74검체 및 요 204검체를 임의로 선택하였다. 증식 세균수가 서로 다른 요검체를 A검체(6×10^3 CFU/mL), B검체(3×10^4 CFU/mL)와 C검체($>10^6$ CFU/mL)를 각각 10 µL씩 20회 반복 접종하여 정밀도를 평가하였다. 수기법과 자동화 장비법의 상관관계는 한천배지에서 자란 독립된 균집락을 계수하여 비교 분석하였다. 또한 각 방법의 검체 접종 소요시간을 비교하였다.

결과: 자동화 장비의 변이계수는 A, B 그리고 C 검체에서 각각 176.1, 18.1과 12.6이었다. 수기법과 자동화 장비법의 비교 평가에서 수기법을 기준으로 하였을 때 채액검체에서는 자동화 방법의 민감도와 특이도가 각각 77%와 100%이고, 일치도는 96%이다. 요검체에서 자동화 방법의 민감도와 특이도는 모두 87%를 보였고 일치도는 90%이다. 수기법과 자동화 장비법으로 검체 접종시의 소요시간을 비교해 본 결과, 요 15검체, 채액 15검체 접종을 위하여 수기법으로는 각각 10분과 15.4분이 소요되었고 자동화 장비법으로는 각각 10분과 5.7분이 소요되었다.

결론: 자동화 장비 PREVI Isola® (BioMerieux)는 수기법과의 일치도가 채액검체와 요검체가 96%와 90%로 비교적 우수하였고, 특히 다양한 종류의 임상 검체 접종 시 소요시간 감소 효과가 있을 것으로 판단하였다.

참고문헌

1. Woods GL. Automation in clinical microbiology. Am J Clin Pathol 1992; 98(S):S22-30.
2. Bourbeau PP and Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new auto-

- mated microbiology plating instrument. *J Clin Microbiol* 2009;47:1101-6.
3. Glasson JH, Guthrie LH, Nielsen DJ, Bethell FA. Evaluation of an automated instrument for inoculating and spreading samples onto agar plates. *J Clin Microbiol* 2008;46:1281-4.
 4. Albers AC and Fletcher RD. Accuracy of calibrated-loop transfer. *J Clin Microbiol* 1983;18:40-2.
 5. Chong Y, Lee K, et al. eds. *Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Seoul: Seohung Publishing Company; 2009:58-113.
 6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the precision-performance of clinical chemistry devices; approved guideline. Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2004.
 7. Isenberg HD, ed. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2004.
 8. Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. 1956. *J Urol* 2002;167:1016-9.
 9. Tilton RC and Ryan RW. Evaluation of an automated agar plate streaker. *J Clin Microbiol* 1978;7:298-304.
 10. Scarparo C, Piccoli P, Ricordi P, Scagnelli M. Evaluation of the DipStreak, a new device with an original streaking mechanism for detection, counting, and presumptive identification of urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol* 2002;40:2169-75.