

API 20 A

혐기성 세균의 동정

원리	072
시약	072
배지와 시약의 성분	072
스트립과 배지의 보관	072
시약의 보관	072
시약의 이용	072
사용상 주의사항	073
실험방법	073
사용한 재료의 처리	074
QC	074
판독표	075
검사방법	076
REF. 20 300 : 25 strips+25 media	077

API 20 A | 혐기성 세균의 동정

원리

- API 20 A 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 20개의 마이크로 튜브로 되어 있다.
- 세균 배양액을 이 튜브에 넣고 배양했을때 생성된 대사 산물에 의해 색이 변화되거나 보조 시약의 첨가로 색이 변화되며 이를 통해 결과를 판단한다.
- 배양 후 인터넷 사이트 *apiweb™* (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 동정 결과를 판독 한다.

시약

Kit 구성(25 테스트)

- API 20 A 25 strips
- 배양용박스 25개
- API 20 A Medium 25개
- 결과지 25장
- Package insert 1부

보조 시약(별도구매)

- Mineral oil (ref.70 100)
- 시약 : BCP (ref.70 510)
EHR (ref.70 520)
XYL (ref.70 530)
- McFarland Standard (ref.70 900)
- Identification software (*apiweb™*)
- Hydrogen peroxide (3%)
- 면봉
- PSlpettes (ref.70 250)
- Anaerobic jar 또는 anaerobic chamber
- Ultra violet lamp (365 nm)

필요한 실험 기자재

- 35~37°C incubator
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marking pen

배지와 시약의 성분

API 20 A Medium 4 ml	Trypticase Yeast extract Sodium chloride L-tryptophane L-cystine Hemin(porcine origin) Vitamin K ₁ Sodium sulfite Deminerlized water to make pH 6.9-7.3	5 g 5 g 2.5 g 0.2 g 0.4 g 0.005 g 0.01 g 0.1 g 1000 ml
EHR reagen 5 ml	Paradimethylaminobenzaldehyde Hydrochloric acid Ethanol H ₂ O	0.9 g 6.67 g 82 ml 11.3 ml
BCP reagent	Bromocresol purple H ₂ O	0.02 g 100 ml
XYL reagent 5 ml	Xylene	

스트립과 배지의 보관

스트립과 배지는 2-8°C에서 보관하며 포장에 명시된 유효 기간까지 사용할 수 있다.

시약의 보관

시약은 포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관 한다 (BCP는 2-30°C에서 보관한다.)

시약의 이용

다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30°C)에 꺼내 둔다.

(1) XYL reagent

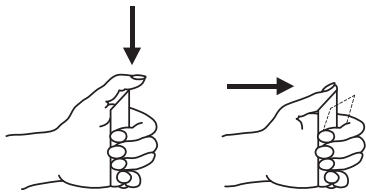
앰플의 뚜껑에 엄지손가락을 올려 놓고 다른 손으로 몸체를 잘 잡은 후 뚜껑의 평평한 부분에 힘을 가해 앰플 윗부분을 절단한다.
꺼꾸로 세운후 뚜껑을 부드럽게 눌러서 시약이 떨어지지도록 한다.

(2) BCP, EHR reagent

앰플을 열고 시약을 한 방울씩 떨어뜨려 사용한다.

사용상 주의사항

- 체외 진단용으로만 사용한다.
- 감염성이 있는 시약에 대해 주의 사항을 만들고 무균적으로 사용하도록 한다.
- 검체나 시약을 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
- 유효기간이 지난 시약은 사용하지 않는다.
- 사용하기 전에 실온에 꺼내 두었다가 사용한다.
- 앰플을 열 때 주의한다.



- 앰플을 수직이 되도록 한 손으로 잡는다. (흰색 뚜껑이 위로 가도록)
- 뚜껑을 가능한 한 아래로 꼭 누른다.
- 엄지손가락으로 뚜껑의 평평한 부분을 찢는다.
- 뚜껑 안의 앰플의 윗 부분을 잘라내기 위해서 뚜껑의 평평한 부분에 엄지손가락을 놓고 압력을 가한다.
- 스포이드 뚜껑이 없는 앰플의 경우에는 조심스럽게 뚜껑을 제거한다.
- 스포이드 뚜껑이 있는 경우에는 앰플의 윗부분을 돌려서 수직을 유지하고 모든 시약을 스포이드 병에 담는다.

- 미생물 실험이 끝난 모든 시약은 감염 될 가능성이 있으므로 적절한 조작을 하여야 한다.
- 임상 가검물과 배양된 미생물은 감염의 위험이 있으므로 숙련된 검사자에 의해 주의해서 다루어져야 한다. 무균 조작과 유용한 조작상의 주의 사항은 다음의 과정을 통해 준수하여야만 한다 “CLSI/NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - Current revision”.
- 추가적인 실험은 “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Latest edition”을 참조하거나 각 나라의 규정에 따라 유의하여 조작한다.
- 실험이 끝나면 실험에 사용한 모든 제품은 완전 멸균 상태로 폐기 처리해야 한다.
- 테스트 결과의 해석은 환자의 병력, 검체의 종류 및 현미경적 소견을 고려하여 미생물학자에 의해서 이루어져야 한다. 만약 필요하다면 다른 종류의 테스트 결과 특히 항생제 감수성 검사를 시행한다.

실험방법

접종액의 준비

- API 20 A Medium의 앰플을 연다.
- 무균 처리된 면봉을 이용하여 (혐기성 환경에서 배양 된) blood agar plate에 자란 균체를 모아 앰플에 넣고 혼탁도가 3 McFaland 이상이 되도록 균액을 만든다. 균의 성장이 느린 경우 1plate 이상 준비.

* **NOTE**: 혐기성 환경의 유지를 위해 균 접종시 지나치게 균액을 젖거나 흔들지 않도록 한다. 또한 만들어진 균액은 바로 사용하여야 한다.

* **TIP** 큐플
튜브

스트립의 준비

배양 환경에 따라 방법을 달리 한다.

• Anaerobic chamber에서 배양하는 경우

- 공급된 incubation box의 바닥의 홈에 멸균 증류수 5ml를 골고루 부어 습기를 유지할 수 있도록 한다.
- Tray의 튀어 나온 부분에 균주에 대한 정보를 기록한다.
- API 20 A strip을 incubation box의 tray에 올려 놓는다.
- PSlpettes으로 API 20 A의 각 well에 균액을 분주한다. 이때 기포가 생기지 않도록 한다.
- **[GEL]**은 튜브와 큐플까지 균액으로 가득 채운다.
- **[IND]**은 튜브까지 균액으로 채우고 증발을 막기위해 mineral oil로 큐플을 채워준다.
- 뚜껑을 덮고 36°C ± 2°C에서 24시간 동안 배양한다.

• Anaerobic jar에서 배양하는 경우

- API 20 A strip을 꺼내어 비어 있는 petridish에 수직으로 세워 놓고 구부러서 strip의 양쪽 끝을 테이프로 붙여 준다.
- petridish에 균주에 대한 정보를 기록한다.
- 무균 파이펫으로 거품이 생기지 않도록 각 well에 균액을 분주하며 이때 큐플은 채우지 않는다.
- **[IND]**은 튜브를 약간 덜 채운 후 mineral oil로 상단을 채워준다.
- 뚜껑을 덮고 36°C ± 2°C에서 24시간동안 배양한다.

• Incubation with Mineral oil

- incubation box에 증류수 5 ml를 골고루 부어 습기를 유지하도록 한다.
- Tray의 튀어나온 부분에 균주에 대한 정보를 기록한다.
- API 20 A strip을 incubation tray에 올려 놓는다.
- 무균 파이펫으로 API 20 A의 각 well에 기포가 생기지 않도록 분주한다.
- API 20 A Medium을 tube부분까지만 채운다.
- 모든 큐플에 mineral oil을 채운다.
- 뚜껑을 덮고 36°C ± 2°C에서 24시간동안 배양한다.

API 20 A | 혐기성 세균의 동정

스트립의 판독

- 대부분의 혐기성 세균의 반응은 24시간 동안에 명확하게 나타나지만 몇몇 세균은 느리게 성장하여 48시간 이후에야 동정할 수 있다.
- 36°C ± 2°C에서 24시간 배양 후 리딩 테이블을 참조하여 결과를 리딩한다.
- 결과지에 발생한 모든 결과를 기록한다.
 - BCP시약은 모든 당 튜브(IND, URE, GEL, ESC 제외)에 한 방울을 떨어뜨리고 yellow나 yellow-green이 나오면 양성이다.
 - IND test : 광유를 넣은곳에 XYL시약을 한 방울 넣고 applicator stick으로 혼합하여 2-3분 간 둔다. 여기에 EHR시약 한 방울 넣고 5분 안에 판독을 하는데 빨간색이 나오면 양성으로 판정한다.
 - CAT test : 스트립을 공기중에 30분 간 노출시킨 후 microtube에 3% Hydrogen peroxide 2방울을 첨가하고 거품이 일어나면 양성이다.

결과의 해석

- 발생된 반응을 numerical profile로 코드화 한다.
- API 20 A는 20개의 테스트와 Catalase반응과 3가지의 형태학적 특징 (Spore, Gram 염색, Coccus)을 고려한다.
- 결과지 위에 테스트를 3개씩 묶어서 양성일 경우에 차례대로 1, 2, 4의 값으로 계산하여 8자리의 숫자로 만든 후 *apiweb™*에 접속하여 결과를 얻는다. (*apiweb™* 주소 : <https://apiweb.biomerieux.com>)

사용한 재료의 처리

앰플, 피펫, 팁 그리고 스트립 모두는 사용 후 멸균 처리하여 폐기처분한다.

QC

- 배지와 스트립 그리고 시약은 각각의 제조 과정의 여러 단계에서 체계적으로 조절된다.
- 스트립에 대한 자체 품질관리를 확인하고자 하면 다음의 균주를 사용하도록 한다.

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	V	-	+	-
2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Clostridium perfringens*

ATCC 13124

2. *Bacteroides ovatus*

ATCC 8483

3. *Clostridium sordellii*

ATCC 9714

*이 반응은 사용된 배지에 따라 달라 질 수도 있습니다.

판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
IND	L-tryptophane	0.98	INDole formation	XYL - mix / 2-3 min + EHR / 5 min yellow red	
URE	urea	0.648	UREase	yellow-orange	red
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (bovine origin)	1.96 1.96 1.96 1.86	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose (sucrose) D-maltose salicin D-xylose L-arabinose	1.96 1.64 1.64 1.64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicin) acidification (XYLose) acidification (ARABinose)	purple	yellow / yellow-green
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no diffusion of pigment (1)	diffusion of black pigment (1)
ESC	esculin ferric citrate	0.36 0.11	hydrolysis (β -glucosidase) (ESCulin)	yellow (2)	brown-black (2)
				in UV (365 nm)	
				fluorescence	no fluorescence
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycerol D-cellobiose D-mannose D-melezitose D-raffinose D-sorbitol D-rhamnose D-trehalose	1.82 1.86 1.96 1.96 2.18 2.18 1.96 1.96	acidification (GLYcerol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MeLEZitose) acidification (RAFFinose) acidification (SIRbitol) acidification (RHAmnose) acidification (TREhalose)	BCP	
				purple	yellow / yellow-green
CAT		-	CATalase	After 30 min in air H ₂ O ₂ in a positive tube	
				no bubbles	bubbles
SPOR		-	spores	absent	present
GRAM		-	Gram reaction	pink	violet
COCC		-	morphology	rod	coccus

(1) Round jar에서 배양할때는 pigment가 Round tube의 아랫부분에 퍼져있다.

(2) Brown-black color는 종종 공기 중에 노출된 후 발생되므로 reading 시 고려해야 함.

Brown-black color는 H₂S와 ferric citrate의 반응으로 이는 esculin hydrolysis를 의미하지는 않으며, ferric sulphide는 튜브의 아래부분에 검은 침전을 생성하는 반면에 esculin hydrolysis는 튜브 윗부분에 암갈색으로 퍼지는 현상을 나타낸다. 만약 튜브 전체가 검은색이면 UV등을 비추어 형광을 띠는지 확인한다.



ESC +
H₂S -



ESC - / +
H₂S + / -

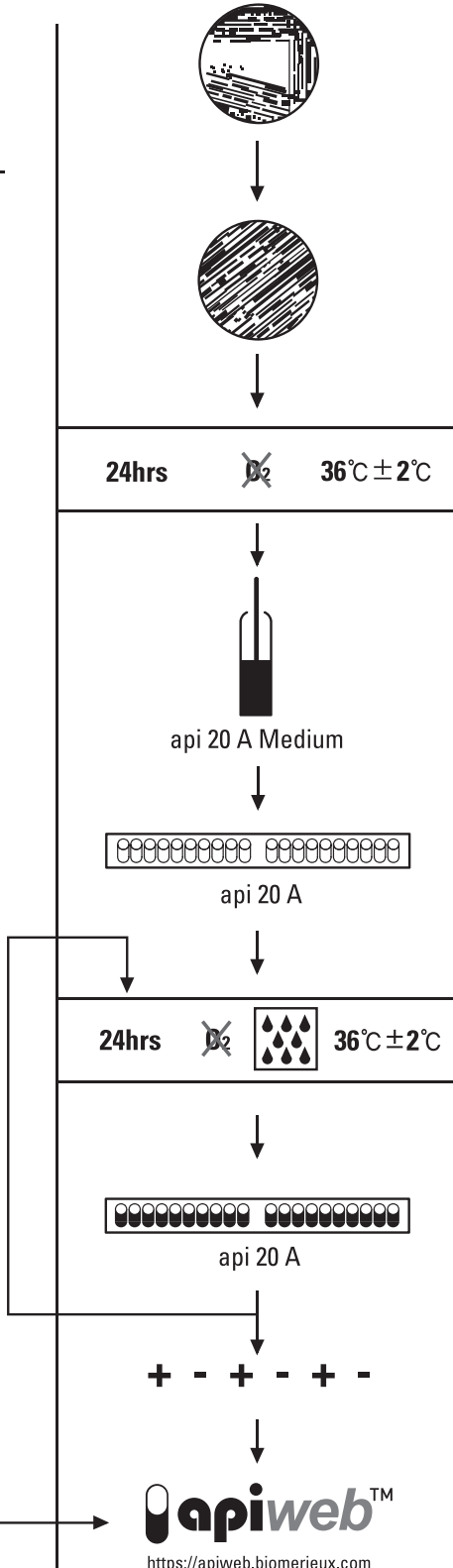


ESC -
H₂S +

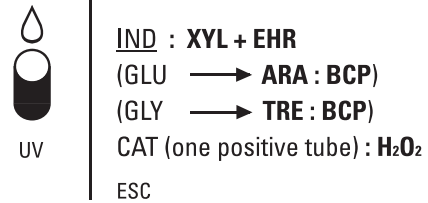
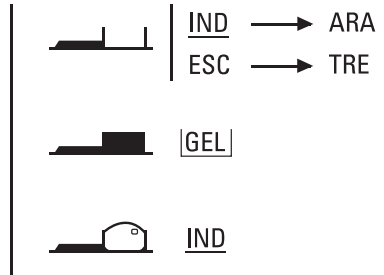
API 20 A | 혐기성 세균의 동정

검사방법

SPOR - GRAM - COCC



3 McF



22-23-24 Test

apiwebTM
<https://apiweb.biomerieux.com>

api[®] 20 A

API 20 A V4.0	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	SPOR	GRAM	COCC
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	99	99	89	99	99	99	99	97	0	30	25	90	90	38	82	40	45	90	1	0	100	0
<i>Actino.meyeri/odontolyticus</i>	1	0	99	1	72	98	93	31	62	37	5	5	50	0	0	0	10	1	15	0	2	0	100	1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0	5	99	26	72	96	94	55	0	0	16	21	47	50	70	5	60	16	0	46	11	0	99	0
<i>Actinomyces viscosus 1</i>	0	0	99	0	65	99	99	22	0	0	7	1	60	17	95	0	99	0	0	5	90	0	100	0
<i>Actinomyces viscosus 2</i>	0	0	60	0	0	60	0	5	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	80	0	100	0
<i>Bacteroides caccae</i>	0	0	100	0	100	100	75	0	100	100	0	90	10	0	100	25	100	0	60	70	0	0	0	0
<i>Bacteroides distasonis</i>	0	0	99	0	99	99	93	73	86	27	1	80	4	60	95	65	98	1	80	70	77	0	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	99	0	99	99	99	0	99	0	1	99	1	41	99	0	99	0	2	0	96	0	0	1
<i>Bac.ovatus/thetaiotaomicron</i>	80	1	99	7	99	99	99	28	99	99	3	95	1	65	99	23	99	2	99	83	65	0	0	0
<i>Bacteroides stercoris/eggerthii</i>	99	0	99	1	92	25	90	10	75	70	10	65	0	30	99	0	30	0	65	0	50	0	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	91	0	99	0	99	99	95	97	99	95	3	99	0	99	99	1	98	0	42	1	9	0	0	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0	0	99	0	99	98	98	0	99	92	5	23	1	8	99	0	94	0	77	3	2	1	0	1
<i>Bifidobacterium spp 1</i>	0	0	99	30	99	99	99	70	60	75	2	40	0	40	70	20	91	25	0	35	0	0	99	0
<i>Bifidobacterium spp 2</i>	0	0	99	99	99	99	99	99	90	80	1	75	45	99	99	85	100	75	50	99	0	0	99	0
<i>Clostridium baratii</i>	0	0	99	8	75	99	80	99	0	0	0	75	54	99	99	0	0	8	8	8	0	99	99	0
<i>Clostridium beijerinckii/butyricum</i>	1	0	99	47	95	99	98	97	80	10	76	54	95	95	20	80	31	25	90	0	100	89	0	
<i>Clostridium bifermentans</i>	90	0	75	0	0	0	70	10	0	0	90	6	5	0	50	0	0	4	0	0	0	97	99	0
<i>Cl.botulinum/sporogenes</i>	20	0	55	0	0	1	72	0	0	0	99	20	1	1	1	0	0	1	0	40	0	99	99	0
<i>Clostridium cadaveris</i>	98	0	87	0	0	6	6	0	0	1	84	0	0	0	40	0	0	1	0	5	0	99	97	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0	0	90	0	77	99	99	88	91	94	5	75	0	77	99	75	94	1	86	88	25	75	75	0
<i>Clostridium difficile</i>	0	0	99	80	0	0	0	20	5	0	44	30	0	5	66	83	0	5	1	5	0	98	99	0
<i>Clostridium histolyticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	0
<i>Clostridium innocuum</i>	0	0	99	99	0	46	0	99	5	15	1	45	1	99	99	4	1	0	0	25	0	99	99	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	0	0	99	0	99	92	99	99	0	0	0	99	0	99	99	0	7	7	0	21	0	99	99	1
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	99	2	95	95	99	1	0	0	99	4	54	4	99	0	16	10	0	76	1	84	99	0
<i>Clostridium ramosum</i>	1	0	99	80	99	99	99	99	0	0	0	40	0	99	99	0	60	0	57	94	0	92	75	0
<i>Clostridium septicum</i>	0	0	99	1	99	0	94	94	0	1	75	35	0	76	99	0	0	0	1	84	1	99	99	0
<i>Clostridium sordellii</i>	99	99	95	0	0	0	90	0	0	0	95	0	0	1	4	0	0	4	0	0	0	99	99	0
<i>Clostridium spp</i>	10	1	1	0	0	0	1	0	0	0	90	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	99	0
<i>Clostridium tertium</i>	0	0	99	99	99	99	99	99	70	0	0	35	0	99	99	62	0	1	0	85	0	99	99	0
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0	0	100	0	99	90	90	75	0	0	0	40	0	75	99	0	0	0	0	70	0	100	0	0
<i>Eggerthella lenta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	60	0	100	0
<i>Eubacterium limosum</i>	0	0	100	70	0	0	0	4	1	1	4	4	10	0	4	0	0	0	0	0	5	0	100	0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	0	0	99	0	0	70	15	75	5	0	5	25	25	25	75	0	75	0	0	23	3	0	0	0
<i>Fuso.necrophorum/nucleatum</i>	94	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium varium</i>	70	0	81	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	0	0	100	8	5	90	100	8	0	0	0	5	0	5	100	0	5	5	0	20	0	0	100	99
<i>Lactobacillus acidophilus/jensenii</i>	0	0	99	3	80	99	96	99	1	0	3	75	8	99	99	5	15	5	3	90	0	0	100	0
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	98	99
<i>Peptostreptococcus group</i>	0	5	5	0	1	0	1	1	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	94	100
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
<i>Prevotella bivia</i>	1	0	99	1	99	0	99	1	1	1	50	0	80	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	32	0	99	0	0	35	98	0	0	0	70	1	4	1	85	0	19	0	1	1	1	0	0	3
<i>Prevotella melaninogenica/oralis</i>	0	0	97	1	97	83	97	31	2	1	20	51	18	53	97	1	89	0	12	4	0	0	0	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	67	0	97	20	1	5	0	0	0	0	69	0	97	0	97	0	0	10	0	1	89	0	100	1
<i>Propionibacterium granulosum</i>	0	0	99	41	0	82	31	0	0	1	18	0	99	0	98	25	35	0	4	67	79	0	100	0
<i>Propioni.propionicum/avidum</i>	0	0	92	50	50	73	80	0	2	5	40	0	45	0	50	2	75	0	1	30	30	0	82	0
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	0	25	87	0	5	0	0	0	0	5	0	5	75	0	75	0	0	0	5	5	99	0	100	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	0	100	0	22	100	100	100	0	0	0	22	0	33	100	0	0	0	0	66	0	0	100	100
<i>Streptococcus intermedius</i>	0	0	99	20	99	99	99	95	0	0	0	75	0	90	99	6	26	0	0	99	0	0	100	100
<i>Veillonella parvula</i>	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	50	0	1	100

24hrs (36° C ± 2° C)

API 20 A Ref. 20 300 : 25 strips + 25 media

API 20 A 용기성 세균의 동정

