API NH

Neisseria와 Haemophilus 동정

원리 050
시약 050
배지와 시약의 성분 050
스트립과 배지의 보관 050
시약의 보관 050
시약의 이용 050
사용상 주의사항 051
실험방법 051
사용한 재료의 처리 052
QC 052
판독표 053
검사방법 054
READING / LECTURE - INTERPRETATION 055
REF. 10 400 : 10 strips + 10 media 056

API NH | Neisseria와 Haemophilus 동정

원리

- API NH 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 10개의 마이크로튜브로 되어 있고 penicillinase 검출과 12개의 동정시험(효소반응이나 당발효)이 가능하다.
- 이 테스트 튜브들에 세균 부유액을 접종하고 배양시키면 배양 시간 동안 생성된 반응 산물들에 의해 색이 변화 되거나 보조 시약의 첨가로 색이 변화되며 이를 통해 결과를 판단한다.
- 배양 후 인터넷 사이트 api*web*™ (https://apiweb.biomerieux.com)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

배지와 시약의 성분

API NaCl 0.85% Medium 2ml	Sodium chloride Demineralized water	8.5g 1000 ml
ZYM B 8ml	Fast Blue BB Methanol Dimethylsulfoxide (DMSO)	0.12g 40ml 60ml
JAMES reagent 5 ml	R1 : HCl IN R2 : Compound J 2183 (confidential)	100 ml 0.66g

시약

Kit 구성(10 테스트)

- API NH 10 strips
- API NaCl 0.85% medium 10개 (2ml)
- JAMES 시약 1 ampule
- ZYM B 시약 1 ampule
- 배양용 박스 10개
- 결과지 10장
- Package insert 1부

보조 시약(별도구매)

- McFarland Standard (ref.70 900)
- Mineral oil (ref.70 100)
- Identification software (api*web*™)
- PSIpettes (ref.70 250)
- 면봉

필요한 실험 기자재

- 35 ~37 ℃ incubator
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marker pen

스트립과 배지의 보관

스트립과 배지는 2~8℃에서 보관하며 포장에 명시된 유효 기간까지 사용할 수 있다.

시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2~8℃의 암소에서 보관한다. ZYM B 와 JAMES 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고 안에서 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하 여서는 안된다 .
ZYM B 시약은 노란색며 만약 엷은 pink색으로 변하면 시약을 사용하지 않는다.

시약의 이용

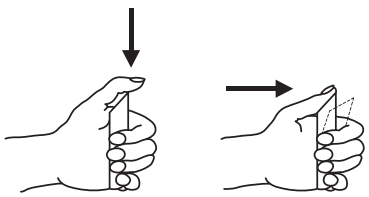
다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20~30℃)에 꺼내 둔다.

(1) ZYM B reagent
앰플을 열고 시약을 한 방울씩 떨구어 사용한다 .

(2) JAMES reagent
시약의 앰플을 열고, 완전히 건조된 파이펫을 이용해서 건조된 활성 성분이 들어있는 dropper -bottle에 용액을 옮겨 담고 뚜껑을 잘 닫은 후 내용물이 잘 섞일 수 있도록 흔들어 준다. 완전히 녹을 때 까지 5~10분간 기다렸다가 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 쥔다.
– 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 유의 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 모두 끝나면 실험에 사용한 모든 제품은 완전 멸균 상태로 폐기처리해야 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

균의 선택

- 균종의 특성을 확인 한다.
- 주의해야 할 균종은 *Neisseria, Haemophilus, Branhamellacatarrhalis*로 같은 모양과 생리학적 특징을 보인다.
  – *Neisseria* (그람음성구균 쌍으로 보임).
  *Branhamella catarrhalis (Moraxella catarrhalis)*도 같은 모양과 생리학적 특징을 보임.
  – *Haemophilus*(작고 여러가지 형태의 모양이며 Gram 음성간균과 같은 영양 요구성이다.) 영양 요구성 세균으로 PolyViteX가 첨가된 chocolate agar와 CO_2가 풍부한 환경에서 잘 자란다.
- API NH 에는 4 McFarland의 균액을 접종한다.
  다음과 같은 배지에서 API NH Strip 사용전에 균주를 계대 배양한다.
  – chocolate agar with PolyViteX or derivative (Thayer Martin Medium) with or without antibiotic.
  – blood agar media (Columbia, Trypticase-Soy, New York City Medium)
  – 만약 균을 분리 하기 위해 다른 배지를 사용한다면 위에 언급한 배지에 subculture하여 사용한다.
- API NH를 사용하기 위한 이러한 배지를 사용할 때는 CO_2가 풍부한 환경에서 subculture를 실시한다. (18~24시간, 35~37℃)

스트립의 준비

- Incubation box를 준비하고 멸균 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다.
- Tray의 끝에 균주의 정보를 기록한다.
- 스트립을 tray 위에 올려놓는다 .

접종액의 준비

- NaCl 0.85%medium(2ml)의 앰플을 열고 면봉으로 순수 분리 배양된 colony를 취하여 혼탁도가 4 McFarland가 되도록 골고루 부유시킨다.
- 만들어진 접종액은 즉시 분주한다.

스트립의 접종

- PEN 에서 URE까지 처음 7개의 microtube 부분은 튜브까지만 채운다.
- 마지막 3개의 microtube인 [LIP/ProA], [PAL/GGT], [β GAL/IND]는 튜브와 큐플까지 채운다.
- PEN 에서 URE까지 처음 7가지의 테스트는 cupule에 광유를 넣어 가득 채운다.
- 배양 박스에 담고 36℃ ± 2℃에서 2시간 ~ 2¼시간 동안 호기적인 상태에서 배양한다.

*TIP

API NH | Neisseria와 Haemophilus 동정

스트립의 판독

- 2시간 배양 후 리딩 테이블을 참조하여 결과를 읽는다.
- 결과지에 발생한 모든 결과를 기록한다 .

* **NOTE** : 마지막 3개 microtube는 같은 튜브내에서 2가지 반응을 확인 할 수 있다.
  8.|LIP| (자연 발생적인 반응) / |ProA| (시약 첨가 반응)
  9.|PAL| (자연 발생적인 반응) / |GGT| (시약 첨가 반응)
  10. |β GAL| (자연 발생적인 반응) / |IND| (시약 첨가 반응)
  따라서 |LIP||PAL||β GAL| 는 시약 첨가 전에 판독한다.

- |LI P/ProA|, |PAL /GGT|에는|ZYMB|시약 을 한 방울 떨어뜨리고, |β GAL/IND|에는 JAMES 시약을 떨어뜨린다.
- 3분간 기다린 후
  – 만약 |LIP|반응이 양성 (blue pigment)이면 |ProA|반응은 ZYM B 시약을 첨가하든 첨가하지 않든 "음성"으로 해석한다.
  – 만약 2시간 배양 후 몇개의 반응이 (fermentation, penicillinase) 의심스러우면 2시간 더 배양해서 다시 리딩한다.
  (이 경우 효소 반응은 다시 reading하지 않는다).

결과의 해석

- 발생된 반응을 numerical profile로 코드화 한다.
- 결과지 위에 테스트를 3개씩 묶어서 양성일 경우에 차례대로 1, 2, 4의 값으로 계산하여 7자리의 숫자로 만든 후 api*web*™에 접속하여 결과를 얻는다. (api*web*™ 주소 : https://apiweb.biomerieux.com)

* warning :첫번째 test는 code화 하지 않는다. (penicillinase)
  First group GLU -FRU -MAL

- Penicillinase test
  양성반응 (yellow.yellow-grean or yellow-blue coloration)은 penicillinase가 존재함을 의미한다. 이러한 효소가 존재함으로써 penicillins (penicillin G, amino-, Carboxy-와 ureido- penicillins)의 사용이 억제 된다. 다른 β- lactam 계는 감수성 test가 필요하다.
- 음성반응 (blue coloration)은 penicillinase가 없음을 의미한다.

사용한 재료의 처리

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

QC

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

	PEN	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	β GAL	ProA	GGT	IND
1	–	+	V	–	–	+	+	–	+	–	–	–	+
2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
3	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–	+	–

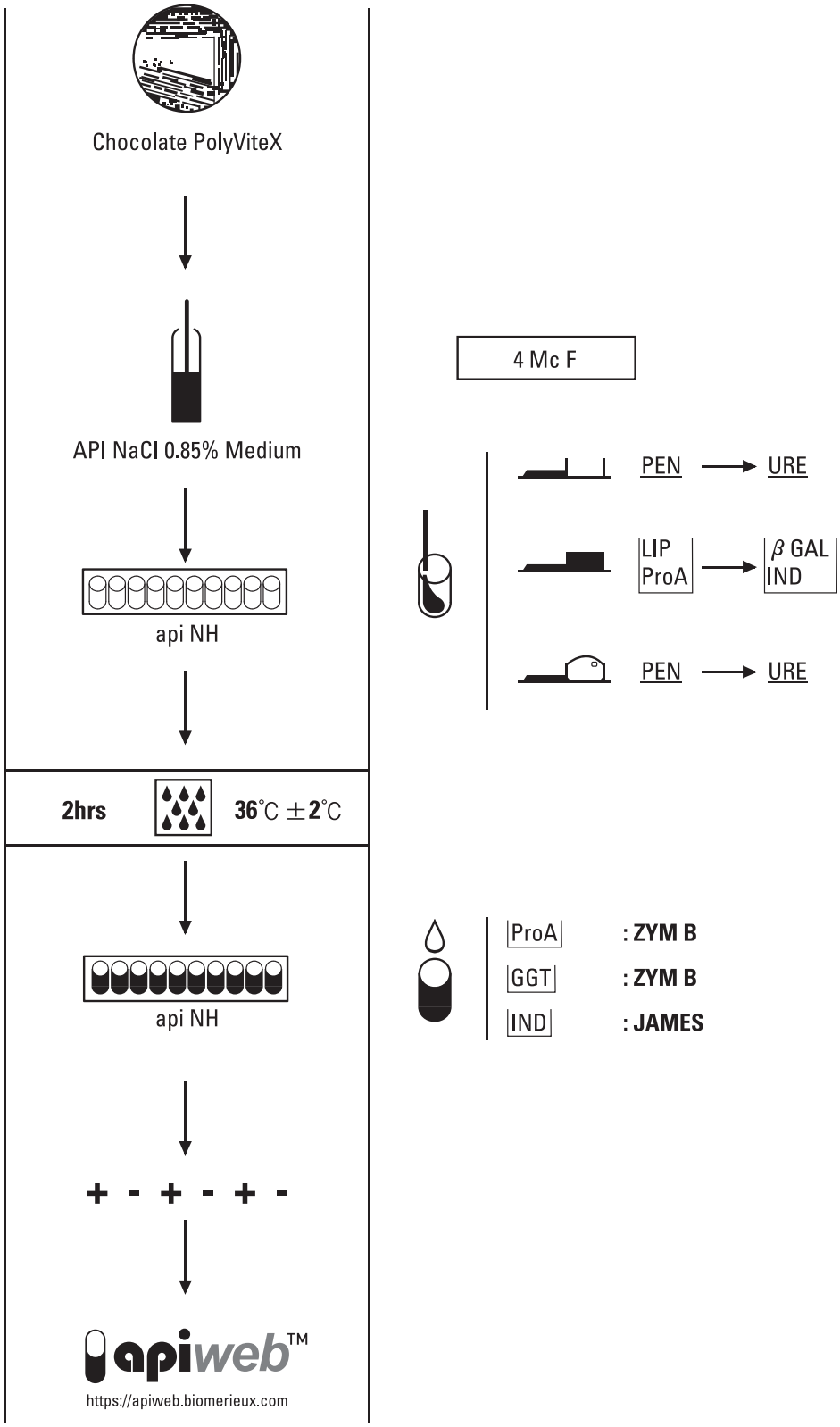
1. Hemophilus influenza ATCC 10211
2.Neisseria gorrohoeae ATCC 31426
3. Hemophilus paraphrophilus ATCC 49917

판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
1) PEN	potassium benzylpenicillin	1.36	PENicillinase	blue (penicillinase absent)	yellow yellow-green yellow-blue (penicillinase present)
2) GLU	D-glucose	0.5	acidification (GLUcose)	red red-orange	yellow orange
3) FRU	D-fructose	0.1	acidification (FRUctose)		
4) MAL	D-maltose	0.1	acidification (MALtose)		
5) SAC	D-saccharose (sucrose)	0.5	acidification (SACcharose)		
6) ODC	L-ornithine	0.552	Ornithin DeCarboxylase	yellow-green grey-green	blue
7) URE	urea	0.41	UREase	yellow	pink-violet
8a) | LIP |	5-bromo-3-indoxyl-caprate	0.033	LIPase	colorless pale grey	blue (+ precipitate)
9a) |PAL|	4-nitrophenyl - phosphatase 2CHA	0.038	ALKaline Phosphatase	colorless pale yellow	yellow
10a)|βGAL|	4-nitropheny - βD - galactopyranoside	0.04	β GALactosidase	colorless	yellow
8b) |ProA|	proline-4-methoxy-β-naphthylamide	0.056	Proline Arylamidase if LIP is +, ProA is always -	ZYM B / 3 min yellow pale orange (brown if LIP +)	orange
9b) |GGT|	y-glutamyl-4-methoxy-β-naphthylamide	0.049	Gamma Glutamyl Transferase	ZYM B / 3 min yellow pale orange (yellow-orange if PAL +)	orange
10b) |IND|	L-tryptophane	0.036	INDole	JAMES / 3 min colorless	pink

API NH | Neisseria와 Haemophilus 동정

검사방법



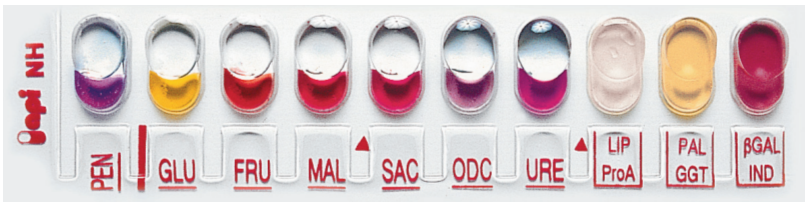
api® NH

READING / LECTURE - INTERPRETATION

Neisseria gonorrhoeae ATCC 31426

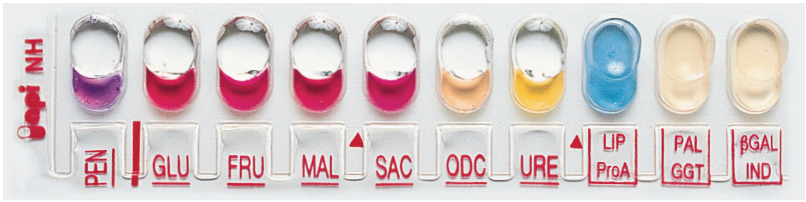
\+ + − − − − − LIP − PAL − βGAL −
ProA + GGL − IND −

Haemophilus influenzae ATCC 10211



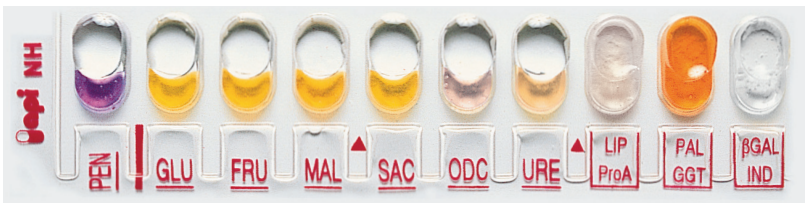
− + − − − + + LIP − PAL + βGAL −
ProA − GGL − IND +

Branhamella catarrhalis ATCC 23246



− − − − − − − LIP + PAL − βGAL −
ProA − GGL − IND −

Haemophilus paraphrophilus ATCC 49917



− + + + + − − LIP − PAL + βGAL +
ProA − GGL + IND −

** 위 예제들이 설명서의 판독표를 대체할 수는 없습니다.

API NH | Neisseria와 Haemophilus 동정

API NH V3.0	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	βGAL	PRO	GGT	IND
Actinobacillus pleuropneumoniae	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0
Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus **	100	96	99	96	0	0	0	100	88	0	29	0
Haemophilus influenzae	100	89	12	1	40	92	0	100	0	0	5	74
Haemophilus paragallinarum	100	100	0	100	0	0	0	100	0	0	1	0
Haemophilus parainfluenzae	100	94	94	97	73	55	0	97	30	0	5	11
Histophilus somni	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	50
Moraxella (Branhamella) catarrhalis **	1	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Neisseria cinerea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	0	0
Neisseria gonorrhoeae	97	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0
Neisseria lactamica	100	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0
Neisseria meningitidis	97	0	90	0	0	0	0	0	0	44	100	0
Neisseria polysaccharea	100	0	100	75	0	0	0	0	0	99	0	0
Neisseria spp *	100	80	86	65	0	0	0	0	0	99	7	0

2hrs (35~37° C)

API NH Ref. 10 400 : 10 strips + 10 media

* Neisseria spp = N. sicca, N. mucosa, N. subflava

** See § Limitations of the method