

API Campy

Campylobacter의 동정

원리	080
시약	080
배지와시약의 성분	080
스트립과배지의 보관	080
시약의 보관	080
시약의 이용	081
사용상 주의사항	081
실험방법	081
사용한재료의 처리	082
QC	082
판독표	083
검사방법	084
REF. 20 800 : 12 strips	085

API Campy | Campylobacter의 동정

원리

- API Campy의 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 20개의 마이크로 튜브로 되어있다.
- 처음 부분은(enzymatic and conventional tests)보통 호기 상태에서 대사 산물이나 보조 시약의 첨가로 인해 판별할 수 있고, 두 번째 부분은(assimilation and inhibition tests) 미호기성 조건으로 배양한다. 기질을 사용할 수 있거나 항생제에 저항성이 있는 균이 자라게 된다.
- 배양 후 인터넷 사이트 *apiweb™* (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

시약

Kit 구성(12 테스트)

- API Campy 12 strips
- API NaCl 0.85% Medium 3ml 앰플 12개
- API AUX Medium 앰플 12개
- 6 McFarland 표준앰플 17개
- 배양용 박스 25개
- 결과지 12장
- Package insert 1부

보조 시약(별도구매)

- Reagents : NIT 1 + NIT 2 (ref.70 442)
 FB (ref.70 560)
 NIN (ref.70 491)
- Oxidase (ref. 55 635)
- Mineral oil (ref.70 100)
- Identification software (*apiweb™*)
- Columbia (sheep) blood agar plates (ref. 43 041)
- PSIpettes (ref.70 250)
- 면봉
- Anaerobic jar + microaerobic generators

필요한 실험 기자재

- 37°C incubator
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marker pen

배지와 시약의 성분

API NaCl 0.85% Medium 3 ml	Sodium chloride DeminerIALIZED water	8.5 g 1000 ml
API AUX Medium 7 ml	Ammonium sulphate Monosodium phosphate Potassium chloride Agar Vitamin solution Trace elements DeminerIALIZED water pH : 7.0-7.2 at 20-25 °C	2.0 g 6.24 g 1.5 g 1.5 g 10.5 ml 10.0 ml 1000 ml
McFarland Standard 6	BaSO ₄	2.88 10 ⁸ mol/l
NIT 1 reagent 5 ml	Sulfanilic acid Acetic acid H ₂ O	0.4 g 30 g 70 ml
NIT 2 reagent 5 ml	N, N-dimethyl-1-naphthylamine Acetic acid H ₂ O	0.6 g 30 g 70 ml
FB reagent 5 ml	Fast Blue BB (> 0.1 %) Sodium lauryl sulfate Organic solvents	0.35 g 7.5 g 100 ml
NIN 1 reagent 5 ml	Ninhydrin 2-methoxyethanol	7 g 100 ml

스트립과 배지의 보관

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

시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관 한다 (NIT 1은 2-30°C에서 보관한다.).

시약은 앰플을 개봉한 후 스포이드가 있는 유리병에 옮겨 담은 후 1달 정도 사용이 가능하다 (개봉한 날짜를 병의 label에 기록할 것). FB와 NIN 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고에 보관하고, 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다. NIN 시약은 공기나 수분에 매우 민감하게 반응한다. 시약은 건조된 파이펫을 이용하여 dropper-bottle에 옮기고 시약병을 단단히 밀봉한다. FB 시약은 병을 개봉하자마자 진한 호박색으로 바뀐다.

시약의 이용

다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30℃)에 꺼내 둔다.

(1) NIT 1, NIT 2 reagent

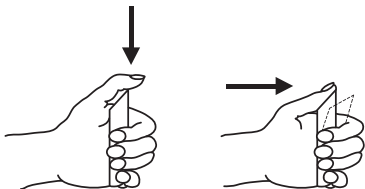
앰플을 열고 시약을 한 방울씩 떨어뜨려 사용한다.

(2) NIN, FB 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 흔들어준다. 완전히 녹을때 까지 5분간 기다렸다가 사용한다.

사용상 주의사항

- 체외 진단용으로만 사용한다.
- 감염성이 있는 시약에 대해 주의 사항을 만들고 무균적으로 사용하도록 한다.
- 검체나 시약을 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
- 유효 기간이 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 친다.
- 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

균의 선택


- 그람음성, spiral or curved, 미호기성 혹은 혐기성에서 자라고, oxidase-positive rods인 것을 분리한다.
- Blood agar plate의 표면에서 잘 분리된 colony를 떼다. 성장속도가 느린 균주의 경우는 몇 개의 plates가 필요하다.
- 미호기성 조건에서 24-48시간 동안 36℃±2℃에서 배양한다(균의 성장이 느린 경우 72시간 까지). 만약 24 시간 후 충분히 자라면 균주는 다시 배양하지 않는다.

스트립의 준비

- 박스에서 스트립을 꺼낸 후 두 부분으로 분리한다. 각각 Incubation box를 준비하고 tray의 끝에 균주의 정보를 기록한다. 멸균 증류수 3ml를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다.

접종액의 준비

- NaCl 0.85% Medium (3ml)을 개봉한 후 면봉을 이용하여 균을 모아 6 McFarland의 탁도를 맞춘다.

* TIP  큐플 튜브

스트립의 접종

- 첫번째 부분
스트립의 URE에서 PAL까지 접종하고 두번째 스트립의 H₂S를 접종한다.
 - 각 튜브에 기포가 생기지 않게 분주하고 H₂S는 튜브까지 채운다.
 - URE는 광유로 큐플을 덮는다.
 - 첫번째 부분 incubation box를 덮고 36℃±2℃에서 24시간 동안 호기조건에 배양한다.
- 두번째 부분은 GLU에서 ERO까지
 - API AUX Medium을 개봉하여 분주하고 남은 접종액 150μl를 넣고 잘 섞는다.
 - 튜브나 큐플에 혼합한 접종액을 분주하고, 두번째 incubation box를 덮고, 36℃±2℃에서 24시간 동안 미호기 상태로 배양한다. (어떤 균주는 혐기성 조건을 요구한다.)

API Campy | Campylobacter의 동정

스트립의 판독

- 첫번째 부분 시약첨가
 - NIT test : NIT 1, NIT 2 한방울
 - HIP test : NIN 3방울
 - GGT, PyrA, ArgA, ASpA, PAL test : FB 시약 한방울
 - 위와 같이 진행하고 5분까지 기다리고 판독표에 의해 판독한다.
- 두번째 부분에서는 [SUT]가 양성이면 모든 assimilation test를 판독하고 음성이면 24시간 재배양한다. (세균이 자란 큐플이 약한 성상이라도 양성으로 간주한다.)
- [SUT]는 양성 성장 기준(positive growth control)이며 48시간 이후에도 음성이면 다른 assimilation test는 일반적으로 음성으로 간주하는 것으로 결과지에 기록한다.
- catalase 반응 결과를 결과지(21번 test)에 입력한다.
- [ERO]는 균주가 Erythromycin에 대한 감수성 결과로 [ERO]가 양성이면 항생제 치료의 목적이 있다.

Growth (opaque) = resistance
 No growth (transparent) = sensitivity

결과의 해석

- 발생된 반응을 numerical profile로 코드화 한다.
- 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.

	URE	NIT	EST	HIP	GGT	TTC	PyrA	ArgA	AspA	PAL	H ₂ S	[GLU]	[SUT]	[NAL]	[CFZ]	[ACE]	[PROP]	[MLT]	[CIT]	[ERO]
1	-	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	V	-	-
2	-	+*	-	-	-	V	-	V	-	-	-	-	+	+	-	V	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	V	V	-	-	-	-	-	-

1. *Campylobacter jejuni*

ATCC 49943

2. *Campylobacter fetus ssp fetus*

ATCC 25936

3. *Campylobacter sputorum ssp bubulus*

ATCC 49916

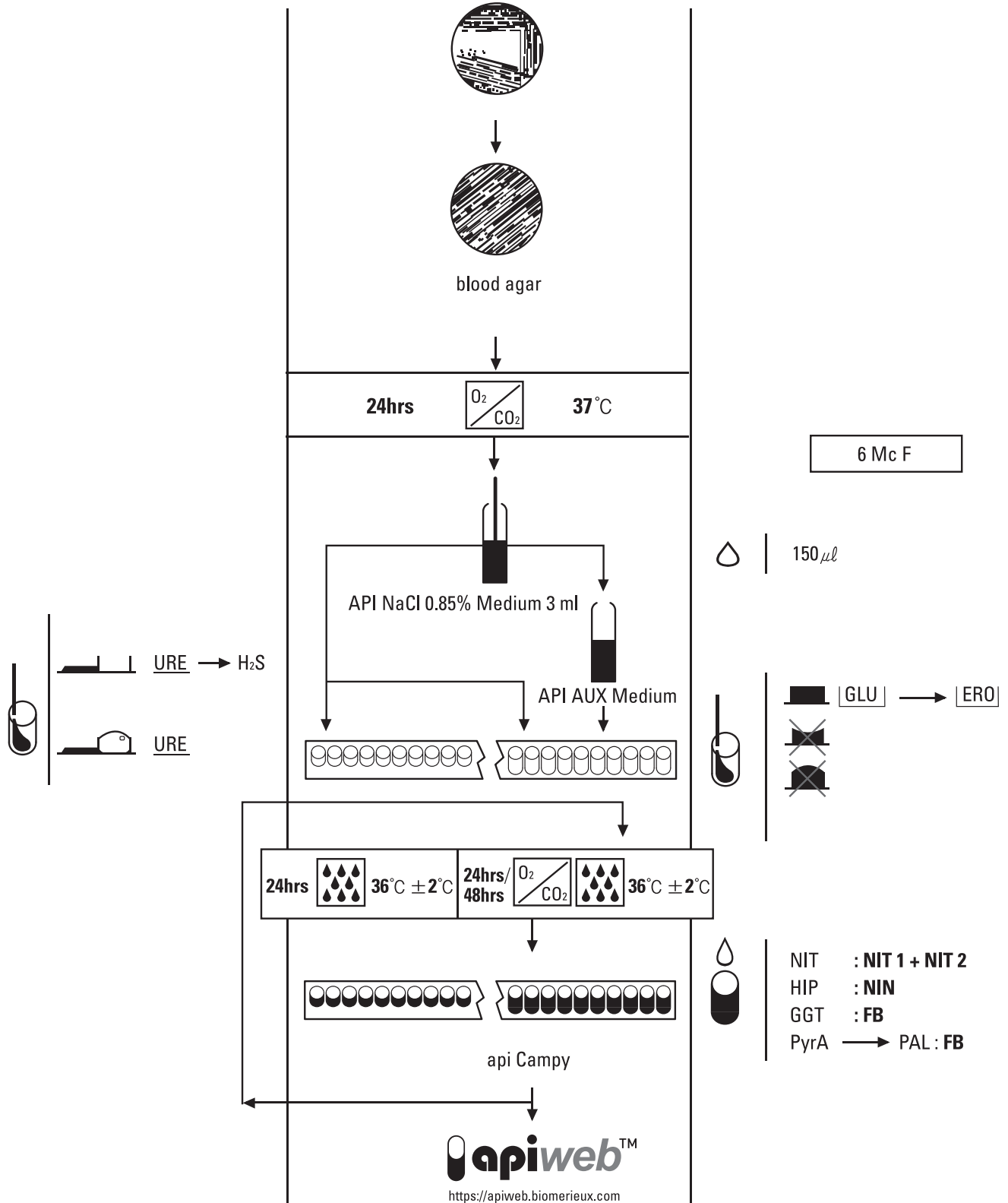
* : Weak positive reactions may occur.

판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup)	REACTIONS	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
URE	urea	0.216	UREase	yellow	orange / red
NIT	potassium nitrate	0.1	Reduction of NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
				colorless	pink / red
EST	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-acetate	0.029	ESTerase	colorless pale blue	turquoise
HIP	sodium hippurate	0.2	HIPpurate	<u>NIN / 5 min</u>	
				colorless bluish-grey	violet
GGT	γ -L-glutamic acid- β -naphthylamide	0.0272	Gamma Glutamyl Transferase	<u>FB / 5 min</u>	
				colorless	dark orange
TTC	triphenyltetrazolium chloride	0.02	Reduction of Chloride to Triphenyl Tetrazolium	colorless pale pink	pink / red or deposit in base of cupule
PyrA	pyroglutamic acid- β -naphthylamide	0.038	Pyrrolidonyl Arylamidase	<u>FB / 5 min (PyrA \rightarrow PAL)</u>	
				colorless	orange
ArgA	L-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide	0.056	L-Arginine Arylamidase	colorless	orange
AspA	aspartic acid- β -naphthylamide	0.039	L-Aspartate Arylamidase	colorless	orange
PAL	2-naphthyl phosphate	0.024	ALkaline Phosphatase	colorless	purple
H ₂ S	sodium thiosulfate	0.076	production of H ₂ S	colorless	black
[GLU]	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparent	opaque (even if weak)
[SUT]	sodium succinate	1.36	assimilation (sodium SUccinaTe)		
[NAL]	nalidixic acid	0.084	growth inhibition (NALidixic acid)		
[CFZ]	sodium cefazoline	0.224	growth inhibition (sodium CeFaZoline)		
[ACE]	sodium acetate	1.1	assimilation (sodium ACEtate)		
[PROP]	propionic acid	1.16	assimilation (PROPionate)		
[MLT]	malic acid	1.56	assimilation (MaLaTe)		
[CIT]	trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)		
[ERO]	erythromycin	0.014	susceptibility - therapeutic prediction (ErythOmycin)		

API Campy | Campylobacter의 동정

검사방법



api[®] Campy

API CAMPY V2.1	URE	NIT	EST	HIP	GGT	TTC	PyrA	ArgA	AspA	PAL	H ₂ S	GLU _a	SUT	NAL	CFZ	ACE	PROP	MLT _a	CIT _a	ERO	CAT
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	20	82	68	0	0	42	0	0	0	82	0	0	57	5	1	76	35	6	0	0	99
<i>Campylobacter coli</i>	0	99	80	0	1	63	0	73	0	77	0	0	98	10	79	61	73	20	25	30	100
<i>Campylobacter fetus ssp fetus</i>	0	97	24	0	1	54	0	55	0	14	0	0	98	79	35	71	3	55	7	2	100
<i>Campylobacter fetus ssp venerealis</i>	0	91	1	0	0	30	0	27	0	0	0	0	94	43	2	36	0	26	0	0	100
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	0	70	9	0	0	50	0	28	0	27	72	0	98	75	5	95	4	60	4	4	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 1</i>	0	98	68	91	0	43	10	4	1	81	0	0	91	4	84	47	2	84	33	1	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 2</i>	0	92	78	99	100	39	15	9	2	73	0	0	96	4	93	59	4	84	25	4	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 3</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Campylobacter jejuni ssp doylei</i>	0	0	29	100	55	33	0	11	3	92	0	0	55	0	6	40	0	37	25	0	100
<i>Campylobacter lari</i>	0	84	5	0	21	18	0	65	1	9	13	0	6	3	1	2	0	2	1	0	100
<i>Campylobacter lari UPTC</i>	100	80	0	0	0	47	0	4	14	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Campylobacter mucosalis</i>	0	0	30	0	0	2	0	7	85	45	80	0	96	48	0	96	0	87	0	3	0
<i>Campylobacter sputorum bv Fecalis</i>	0	100	45	0	1	75	0	37	90	15	99	0	99	45	0	99	0	82	0	2	99
<i>Campylobacter sputorum ssp bubulus</i>	0	72	20	0	0	60	0	1	72	4	88	0	52	20	4	44	0	32	0	0	1
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	0	78	7	8	1	35	0	1	20	70	2	0	30	0	1	16	1	5	1	0	30
<i>Helicobacter cinaedi</i>	0	81	5	0	0	3	0	0	0	14	0	0	15	0	0	31	5	6	0	0	100
<i>Helicobacter fennelliae</i>	0	5	88	0	0	1	0	25	1	90	0	0	40	0	0	0	12	70	0	0	99
<i>Helicobacter pylori</i>	98	0	1	0	91	0	0	4	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100

24hrs (36° C ± 2° C)

API Campy Ref. 20 800 : 12 strips