

API Coryne

Coryneform bacteria의 동정

원리	058
시약	058
배지와 시약의 성분	058
스트립과 배지의 보관	058
시약의 보관	058
시약의 이용	059
사용상 주의사항	059
실험방법	059
사용한 재료의 처리	060
OC	060
판독표	061
검사방법	062
READING / LECTURE - INTERPRETATION	063
REF. 20 900 : 12 strips + 10 media	064

API Coryne | Coryneform bacteria의 동정

원리

- API Coryne 스트립은 당의 발효나 효소 활성도를 확인하기 위한 건조된 기질을 함유하고 있는 20개의 튜브로 되어 있다.
- 배양 후 인터넷 사이트 *apiweb™* (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

시약

Kit 구성 (12 테스트)

- API Coryne 12 strips
- API GP Medium 12 ampules
- API Suspension Medium 3ml 12 ampules
- 결과지 12장
- 6 McFarland 1 ampule
- 배양용 박스 12개
- Package insert 1부

보조 시약 (별도구매)

- Reagents : NIT 1 + NIT 2 (ref.70 442)
ZYM A (ref.70 494)
ZYM B (ref.70 493)
PYZ (ref.70 492)
- Mineral oil (ref.70 100)
- Hydrogen peroxide (3%)
- Densimat (ref.99 234)
- Identification software (*apiweb™*)
- PSlpettes (ref.70 250)
- 면봉

필요한 실험 기자재

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

배지와 시약의 성분

API GP Medium 2 ml	L-cystine Tryptone (bovine/porcine origin) Sodium chloride Sodium sulfite Phenol red Deminerlized water to make pH : 7.4~7.8	0.5 g 20 g 5 g 0.5 g 0.17 g 1000 ml
API Suspension Medium 3 ml	Deminerlized water	
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
ZYM A reagent 8 ml	Tris-hydroxymethyl-aminomethane Hydrochloric acid (37 %) Sodium lauryl sulfate H ₂ O	25 g 11 ml 10 g 100 ml
ZYM B reagent 8 ml	Fast Blue BB 2-methoxyethanol	0.35 g 100 ml
PYZ reagent 5 ml	Iron (II) chloride (FeCl ₂) Preservative 2-methoxyethanol	1 g 6 g 100 ml
Mc Farland Standard 6	BaSO ₄	2.88 10 ⁻⁴ mol/l

스트립과 배지의 보관

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

시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관한다 (NIT 1, ZYM A는 2-30°C에서 보관한다).

시약은 앰플을 개봉하고 스포이드가 있는 유리병에 옮겨 담은 후 1달 정도 사용이 가능하다 (개봉한 날짜를 병의 label에 기록할 것).

ZYM B와 PYZ 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고 안에서 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다.

PYZ 시약은 물이나 공기의 노출에 매우 민감하다. 시약은 건조된 pipette를 이용하여 dropper-bottle에 옮기고 잘 밀봉해 둔다.

ZYM B 시약은 노란색이며 만약 pink색 으로 변하면 폐기한다.

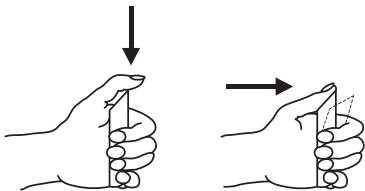
2-8°C에서 ZYM A 시약은 침전을 형성하지만 시약의 특성에는 영향을 끼치지 않으며 실온에 두면 없어진다.

시약의 이용

시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20~30 °C)에 꺼내 둔다.

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 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 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 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

Corynebacter는 그람 양성, non-sporeforming, 통성 혐기성 간균이다.

- Hemolysis의 형태를 확인하고
- 순수 분리된 Colony 하나를 취하여 0.3 ml의 멸균 증류수에 부유한다. 이 부유액을 columbia sheep blood agar에 분주하여 37°C에서 24-48시간 동안 배양한다.

스트립의 준비

- Incubation box를 준비하고 5ml 정도의 멸균 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다.
- Tray의 끝에 균주의 정보를 기록한다.
- 스트립을 tray 위에 올려놓는다.

접종액의 준비

- Suspension medium (3 ml)의 앰플을 열고 면봉을 이용하여 준비된 배지에 서 균을 모아 6 McFarland 이상의 탁도의 접종액을 만든다.

스트립의 접종

- 스트립에서 11개 테스트는 (NIT-[GEL])
 - NIT에서 ESC는 각 큐플당 100µl ~ 150µl를 분주하고
 - URE는 튜브까지만 채우고 [GEL]은 튜브와 큐플을 채운다.
- 나머지 9개 테스트는 (test Q에서 GLYG)
 - API GP Medium에 나머지 부유액(0.5ml)을 잘 섞은후 튜브까지만 분주한다.

URE 와 Q에서 GLYG까지는 광유를 첨가하고 배양용 tray 위에 놓은 후 호기적 조건으로 36°C ± 2°C에서 24시간 동안 배양한다.

* TIP 큐플 튜브

API Coryne | Coryneform bacteria의 동정

스트립의 판독

- 배양한 후에 보조시약을 첨가한다.
 NIT test : NIT 1, NIT 2 시약을 한방울씩 첨가
 PYZ test : PYZ 시약 한방울 첨가
 PyrA, PAL,β GUR,β GAL,α GLU,β NAG test : ZYM A, ZYM B 시약 한방울씩 첨가
- 10분 후에 판독표를 보고 반응을 확인한다.
 만약 필요하다면 Strip을 강한빛(1,000 W)에 10초 간 노출시켜 10분 뒤 판독한다.
 Pyr A →β NAG
- 21번째 CATalase test는 ESC나 [GEL]에 3% hydrogen peroxide 한 방울을 넣고 1분 후에 기포가 생기면 양성이다.

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 *apiweb™*에 접속하여 결과를 얻는다. (*apiweb™* 주소 : <https://apiweb.biomerieux.com>)

사용한 재료의 처리

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

QC

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

	NIT	PYZ	PyrA	PAL	βGUR	βGAL	αGLU	βNAG	ESC	URE	[GEL]	Q	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	V	-	+	+	+	-	+	-	+	V	+
3	-	+	-	V	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

- Corynebacterium renale* ATCC 19412
- Cellulosimicrobium cellulans** ATCC 27402
- Microbacterium testaceum*** ATCC 15829

**cellulosimicrobium cellulans*는 API Coryne에서 *Oerskovia xanthineolytica*로 동정된다.

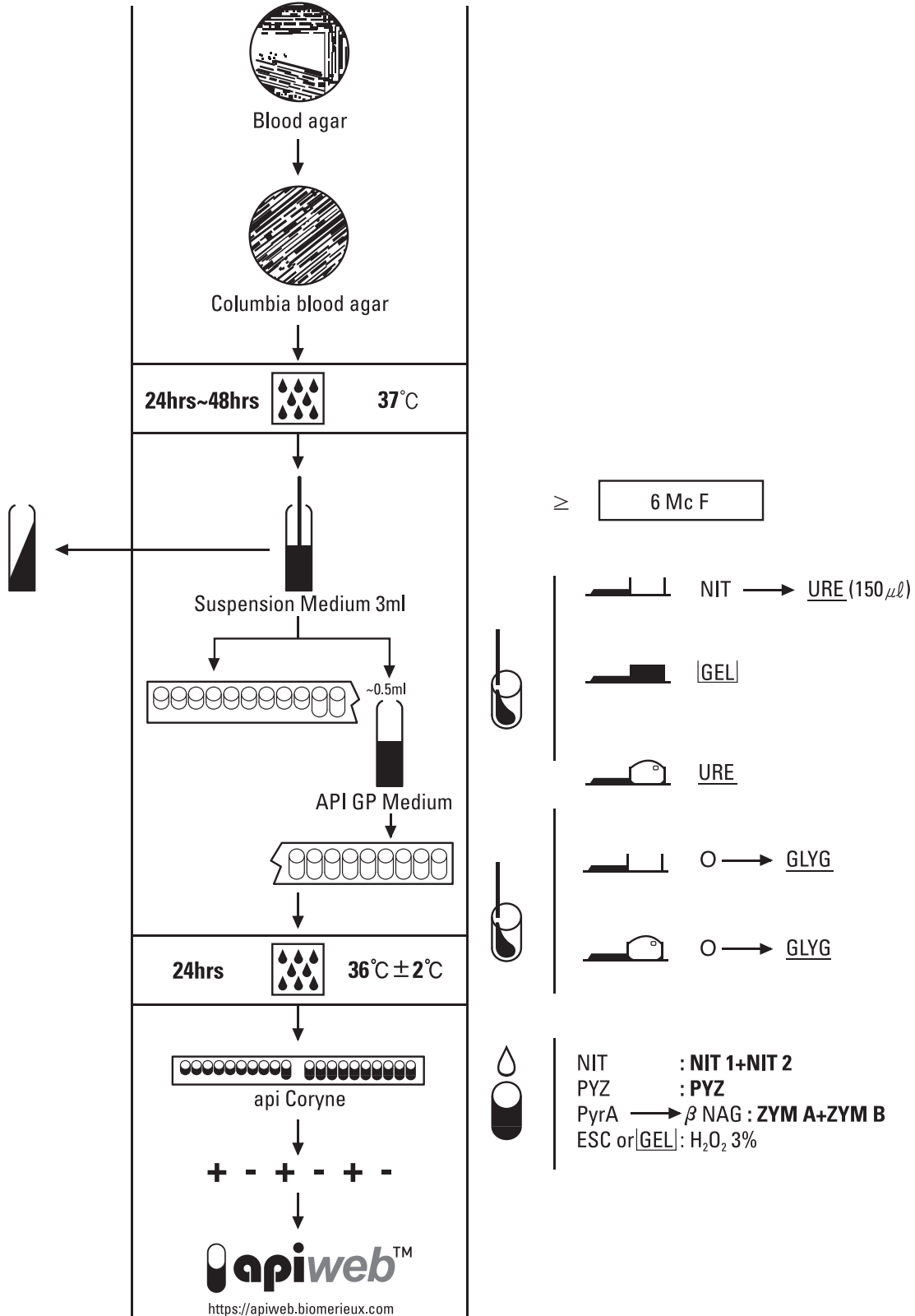
**데이터베이스에 포함되지 않음

판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NIT	potassium nitrate	0.136	reduction of NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u>	
				colorless very pale pink	dark pink red
PYZ	pyrazinecarboxamide	0.56	PYraZinamidase	<u>PYZ / 10 min</u>	
				colorless very pale brown very pale orange	brown orange
PYRA	pyroglutamic acid- β - naphthylamide	0.0256	PYRrolidonyl Arylamidase	<u>ZYM A + ZYM B (PyrA \rightarrow βNAG) / 10 min</u>	
				colorless pale orange	orange
PAL	2-naphthyl - phosphate	0.0244	Alkaline Phosphatase	colorless beige - pale purple pale orange	purple
β GUR	Naphthyl ASBI- glucuronic acid	0.0548	β - GlucURonidase	colorless pale grey pale beige	blue
β GAL	2-naphthyl- β D- galactopyranoside	0.0312	β - GALactosidase	colorless beige - pale purple	purple
α GLU	2-naphthyl- α D- glucopyranoside	0.0308	α - GLUcosidase	colorless beige - pale purple pale green	purple
β NAG	1-naphthyl- N-acetyl- β D-glucosaminide	0.0348	N-Acetyl - β -Glucosaminidase	colorless beige - pale purple pale brown pale grey	brown
ESC	esculin ferric citrate	0.546 0.078	β - glucosidase (ESCulin)	colorless grey	black
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow orange	red pink
<u>[GEL]</u>	gelatin (bovine origin)	0.6	Hydrolysis (GELatine)	no diffusion of black pigment	diffusion of black pigment
<u>Q</u>	Negative control	-	Fermentation	red orange	yellow yellow - orange
<u>GLU</u>	D-glucose	1.56	Fermentation (GLUcose)		
<u>RIB</u>	D-ribose	1.4	Fermentation (RIBose)		
<u>XYL</u>	D-xylose	1.4	Fermentation (XYLose)		
<u>MAN</u>	D-mannitol	1.36	Fermentation (MANnitrol)		
<u>MAL</u>	D-maltose	1.4	Fermentation (MALtose)		
<u>LAC</u>	D-lactose (bovine origin)	1.4	Fermentation (LACtose)		
<u>SAC</u>	D-saccharose (sucrose)	1.32	Fermentation (SACcharose)		
<u>GLY</u>	glycogen	1.28	Fermentation (GLYcoGen)		
CAT	(ESC or <u>[GEL]</u> test)	-	CATalase	<u>H₂O₂ (3%) / 1 min</u>	
				no bubbles	bubbles

API Coryne | Coryneform bacteria의 동정

검사방법



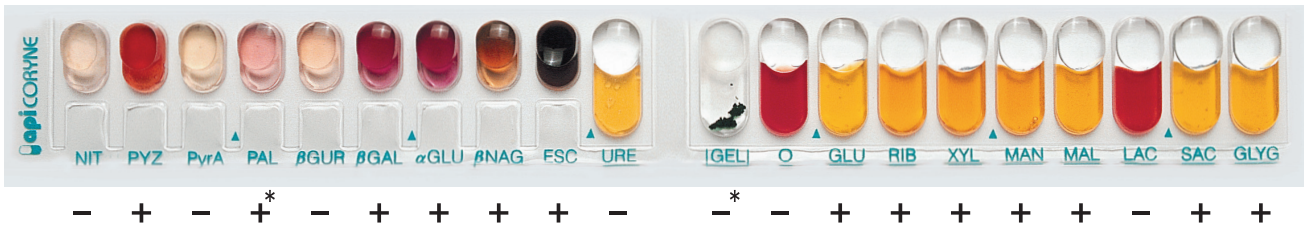
api[®] Coryne

READING / LECTURE - INTERPRETATION

Corynebacterium pseudodiphtheriticum ATCC 10700



Corynebacterium renale ATCC 19412



Listeria grayi ATCC 25401



Actinomyces pyogenes ATCC 49698



** 반응 결과는 시간의 경과에 따라 변화될 수 있습니다. / 위 예제들이 설명서의 판독표를 대체할 수는 없습니다.

API Coryne | Coryneform bacteria의 동정



API Coryne V2.1	NIT	PYZ	PYRA	PAL	BGUR	BGAL	AGLU	BNAG	ESC	URE	GEL	O	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
<i>Actinomyces neuii ssp anitratus</i>	0	100	0	63	0	100	100	0	0	0	0	0	54	89	10	10	36	0	10	0	99
<i>Actinomyces neuii ssp neuii</i>	99	100	0	1	0	100	100	0	0	0	0	0	97	89	24	89	89	1	75	0	100
<i>Actinomyces radingae</i>	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	42	50	35	0	42	0	0	0	0
<i>Actinomyces turicensis</i>	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	0	100	71	0	0	0	100	0	0	0	0	0	50	100	0	0	100	0	0	100	0
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	4	90	59	90	18	85	87	83	0	0	1	0	100	83	1	1	99	100	50	0	1
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	98	71	99	96	98	47	1	0	99	0	100	100	96	1	99	94	56	19	1
<i>Arthrobacter spp</i>	31	100	62	56	37	56	75	14	31	1	50	0	1	1	0	0	0	0	0	0	100
<i>Brevibacterium spp</i>	25	70	70	92	0	20	62	20	20	0	66	0	25	20	7	0	25	20	20	0	100
<i>Cellulomonas spp/Microbacterium spp</i>	42	100	31	22	1	82	100	68	98	0	25	0	100	22	68	65	98	31	98	20	100
<i>Cellulosimicrobium cellulans.</i>	98	100	90	98	1	98	100	90	100	0	95	0	98	98	95	0	98	33	98	76	100
<i>Corynebacterium accolens</i>	100	50	42	0	0	0	0	1	0	0	0	0	100	98	0	7	1	0	28	0	100
<i>Corynebacterium afermentans/coyleae</i>	0	100	76	100	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	0	100	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Corynebacterium auris/Turicella otitidis</i>	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	42	58	100	0	90	0	0	1	60	0	0	42	1	0	0	0	0	0	0	100
<i>Corynebacterium diphtheriae ssp gravis</i>	99	1	0	12	0	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	1	1	99	100
<i>Corynebacterium diphtheriae ssp mitis/belfanti</i>	46	0	0	1	0	0	96	0	0	0	0	0	100	99	0	0	100	0	3	3	100
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	58	100	27	1	100	14	1	0	37	62	1	0	100	47	33	0	27	2	97	0	100
<i>Corynebacterium group F-1</i>	71	100	0	1	0	0	0	0	0	99	0	0	99	28	0	0	100	0	100	0	99
<i>Corynebacterium group G</i>	17	99	42	99	0	0	0	0	1	0	0	0	100	100	0	1	50	0	92	0	100
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	89	5	100	0	0	0	0	1	1	0	0	98	83	0	0	21	0	1	1	99
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	82	64	100	0	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	0	100
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	93	0	38	99	0	0	1	0	0	3	0	0	100	87	0	3	6	1	93	1	99
<i>Corynebacterium propinquum</i>	71	71	35	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	98	93	58	53	0	0	1	0	1	92	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	100
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2	1	0	50	0	0	50	0	0	100	1	0	100	100	0	0	81	0	0	1	100
<i>Corynebacterium renale group</i>	6	85	0	10	100	0	0	0	0	100	0	0	100	99	3	0	0	0	0	0	93
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1	1	1	99	0	1	99	1	1	99	1	0	100	99	1	1	99	1	13	99	100
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	1	98	0	50	0	1	1	0	4	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	100
<i>Corynebacterium striatum/amycolatum</i>	57	97	15	97	0	0	1	0	2	13	0	0	100	45	0	1	71	0	69	1	100
<i>Dermabacter hominis</i>	0	0	99	96	0	100	100	100	100	0	0	0	100	99	31	0	99	99	100	0	100
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1	7	70	0	0	8	0	96	0	14	0	0	67	45	0	0	1	60	0	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4	89	1	0	0	43	65	18	2	1	0	0	99	91	4	2	97	1	13	53	4
<i>Listeria grayi</i>	42	92	0	7	0	0	42	92	100	0	0	0	100	100	0	99	100	92	17	0	98
<i>Listeria monocytogenes/innocua</i>	2	66	0	69	0	4	99	99	100	0	0	0	100	1	3	0	100	64	8	0	100
<i>Listeria spp</i>	2	29	0	58	0	1	94	73	100	0	0	0	100	28	95	0	100	32	2	0	100
<i>Microbacterium spp/Leifsonia aquatica</i>	26	99	10	57	0	63	100	80	95	0	52	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99
<i>Propionibacterium acnes</i>	24	0	63	36	54	89	63	100	0	0	1	0	89	63	0	2	0	0	0	0	100
<i>Propionibacterium avidum</i>	0	9	66	0	0	100	66	97	90	0	78	0	97	90	0	2	78	0	66	0	100
<i>Rhodococcus spp</i>	53	71	13	97	0	1	86	1	50	20	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Rothia dentocariosa</i>	100	100	99	21	0	0	100	0	99	0	2	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100

24hrs (36°C ± 2°C)

API Coryne Ref. 20 900 : 12 strips + 10 media