

API 20 Strep

연쇄상구균의 동정

원리	034
시약	034
배지와 시약의 성분	034
스트립과 배지의 보관	034
시약의 보관	034
시약의 이용	035
사용상 주의사항	035
실험방법	035
사용한 재료의 처리	036
QC	036
판독표	037
검사방법	038
READING / LECTURE - INTERPRETATION	039
REF. 20 600 : 25 strips + 25 media	040

API 20 Strep | 연쇄상구균의 동정

원리

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

시약

Kit 구성(25 테스트)

- API 20 Strep 25 strips
- 배양용 박스 25개
- API GP medium 25 ampules
- 결과지 25장
- 면봉 25개
- Package insert 1부

보조 시약(별도구매)

- Suspension medium, 2ml (ref.70 700)
- Reagent : NIN (ref.70 491)
VP 1 + VP 2 (ref.70 422)
ZYM A (ref.70 494)
ZYM B (ref.70 493)
- Mineral oil (ref.70 100)
- McFarland Standard (ref.70 900)
- Identification software (*apiweb™*)
- Columbia blood agar plates (ref.43 041)
- Schaedler broth (optional)
- PSIpettes (ref.70 250)

필요한 실험 기자재

- 35-37°C incubator
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marker pen
- Anaerobic jar

배지와 시약의 성분

Suspension Medium 2ml	Demineralized water	
API GP Medium 2 ml	L - cystine Tryptone (bovine/porcine origin) Sodium chloride Sodium sulfite Phenol red Demineralized water to make pH : 7.4 ~ 7.6	0.5 g 20 g 5 g 0.5 g 0.17 g 1000 ml
NIN 5ml	reagent Ninhydrin 2-methoxyethanol	7g 100ml
VP 1 reagent 5ml	potassium hydroxide H ₂ O	40g 100ml
VP 2 5ml	α-naphthol Ethanol	6g 100 ml
ZYM A reagent	Tris-hydroxymethyl-aminomethane Hydrochloric acid (37 %) H ₂ O	25 g 11ml 100 ml
ZYM B reagent 8ml	Fast Blue BB 2-methoxyethanol	0.35 g 100 ml

스트립과 배지의 보관

스트립과 배지는 2-8°C 암소에서 보관하여 포장에 명시된 유효 기간까지 사용할 수 있다.

시약의 보관

시약은 포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관 한다. (VP 1, ZYM A은 2-30°C에서 보관한다.)

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

NIN 시약은 수분과 공기에 매우 민감하므로 완전히 건조된 파이펫을 이용해서 건조된 활성성분이 들어있는 dropper-bottle에 시약을 옮기고 두껍을 잘 단아서 사용한다.

ZYM B 시약은 노란색(Yellow)이다. 만약 시약이 pink색으로 바뀌면 폐기한다.

시약의 이용

다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30℃)에 꺼내 둔다.

(1) VP1, VP2, ZYM A, ZYM B reagents

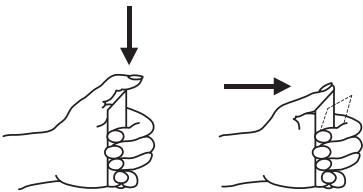
앰플을 열고 시약 한 방울을 버린 후 사용한다.

(2) NIN 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 녹을 때까지 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.
- 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 찌른다.
- 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 M-29-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 , HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)"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

- 동정하고자 하는 균주가 Streptococcus (Gram 양성, Catalase 음성)에 속하는지 확인한다.
- Hemolysis 결과는 결과지 (21번 Test)에 기록해둔다.
- 순수 분리된 colony를 따서 0.3ml의 멸균 증류수에 잘 섞는다.
- Columbia Sheep blood agar plate에 이 suspension을 분주한다 (혹은 멸균된 swab을 이용하여 agar 표면에 분주).
- 36℃ ± 2℃에서 24시간 동안 혐기 상태에서 배양한다.

* NOTE 1 :

- ① β-hemolytic streptococci 나 enterococci 는 24시간 정도면 충분히 자란다.
- ② 다른 streptococci는 48시간 이후에 자라며 특별한 과정이 요구 되는데 이런 경우 다음과 같은 과정으로 진행한다 .
 - 36℃ ± 2℃에서 5시간 동안 1ml scheidler broth에서 배양하고 배양된 증균액은 Columbia sheep blood agar에 전부 부은 후 배지에 있는 여분의 균액은 제거한다.
 - 36℃ ± 2℃에서 18-24시간 동안 혐기상태에서 배양한다.

* NOTE 2 : Pneumococci로 의심되는 경우 충분한 균주를 얻기위해 2개의 plates에 균주를 준비한다.

스트립의 준비

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

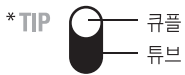
접종액의 준비

- Suspension medium(2ml)의 앰플을 열고 면봉을 사용하여 준비된 배지에서서 균을 모아 4 McFarland 이상의 탁도를 만든다.

API 20 Strep | 연쇄상구균의 동정

스트립의 접종

- VP에서 LAP는 큐플 크기가 절반으로 구성되어 있으며 각각 100 μ l 씩 분주한다. (파스퇴르 피펫으로는 2-3 방울을 넣고 PSipette으로는 5방울을 넣는다.) 그리고 ADH는 튜브에만 채운다.
- RIB에서 GLYG까지는 API GP Medium의 앰플을 열고 세균 부유액(약 0.5ml)과 잘 섞은 후 튜브에만 분주한다.
- ADH부터 GLYG까지는 큐플에 광유를 첨가한다.
- 처음 36 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양 후 판독하고, 필요하다면 두번째 판독은 24시간 배양 후에 진행한다.



스트립의 판독

4시간 배양 후 진하게

- 다음의 보조 시약을 첨가한다.
 - VP Test : VP 1, VP 2 시약 한 방울
 - HIP Test : NIN 시약 2방울
 - PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL과 LAP Tests : ZYMA, ZYMB 시약 한 방울
- 10분 후에 판독표에 의해 결과를 확인한다. 필요하다면 PYRA에서 LAP의 튜브까지 초과 된 시약을 탈색하기 위해 스트립을 강한 빛 (1,000, Lamp에서 10초 동안)에 노출시킨다.

재배양이 필요한 경우

- apiweb™의 database에 없는 정상일 경우
- “IDENTIFICATION NOT VALID BEFORE 24 HOURS OF INCUBATION”와 같은 경우에는 24시간 배양 후에 ESC, ADH, RIB에서 GLYG 반응까지 재확인하고 효소적인 반응 (HIP, PYR A, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP)과 VP 반응은 판독하지 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 apiweb™에 접속하여 결과를 얻는다. (apiweb™ 주소 : <https://apiweb.biomerieux.com>)

* NOTE 1 : 21번째의 hemolytic 반응은 β -hemolysis가 양성으로 판명되면 '4'의 숫자를 쓴다.

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.

	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
1	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
2	+	+	+	V	V	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

1. *Streptococcus equi ssp zoepidemicus*

ATCC 700400

2. *Streptococcus uberis*

ATCC 700407

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

- Inoculum adjusted to between 4.5 and 5.5 McF using DENSIMAT.
- Profiles obtained after : - 4 hours of incubation for tests VP to LAP
- 24 hours of incubation for tests ADH to GLYG.
- Strains cultured on Columbia sheep blood agar.

판독표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS			
				NEGATIVE		POSITIVE	
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / wait 10 min (3) Colorless Pink-red			
HIP	hippuric acid	0.4	hydrolysis(HIPpuric acid)	NIN / wait 10 min Colorless/Pale blue Dark blue/Violet Bluish-grey			
ESC	esculin ferric citrate	1.16 0.152	β -glucosidase hydrolysis (ESCulin)	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
				Colorless Pale yellow	Colorless Pale yellow Light grey	Black Grey	Black
PYRA	pyroglutamic acid - β -naphthylamide	0.0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA to LAP) (1) if necessary, decolorize with intense light Colorless or very pale orange Orange			
α GAL	6-bromo-2-naphthyl - α D-galactopyranoside	0.0376	α -GALactosidase	Colorless		Violet	
β GUR	naphthol ASBI - glucuronic acid	0.0537	β -GIUcRonidase	Colorless		Blue	
β GAL	2-naphthyl- β D - galactopyranoside	0.0306	β -GALactosidase	Colorless or very pale violet		Violet	
PAL	2-naphthyl phosphate	0.0244	ALKaline Phosphatase	Colorless or very pale violet		Violet	
LAP	L-leucine - β - naphthylamide	0.0256	Leucine AminoPeptidase	Colorless		Orange	
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	Yellow		Red	
<u>RIB</u>	D-ribose	1.4	acidification (RIBose)	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
<u>ARA</u>	L-arabinose	1.4	acidification (ARABinose)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>MAN</u>	D-mannitol	1.36	acidification (MANnitol)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1.36	acidification (SORbitol)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>LAC</u>	D-lactose (bovin origin)	1.4	acidification (LACTose)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>TRE</u>	D-trehalose	1.32	acidification (TREhalose)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>INU</u>	inulin	5.12	acidification (INULin)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>RAF</u>	D-raffinose	3.12	acidification (RAFFinose)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>AMD</u>	starch (2)	2.56	acidification (AmiDon)	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>GLYG</u>	glycogen	1.28	acidification (GLYCoGen)	Red or Orange		Bright yellow	

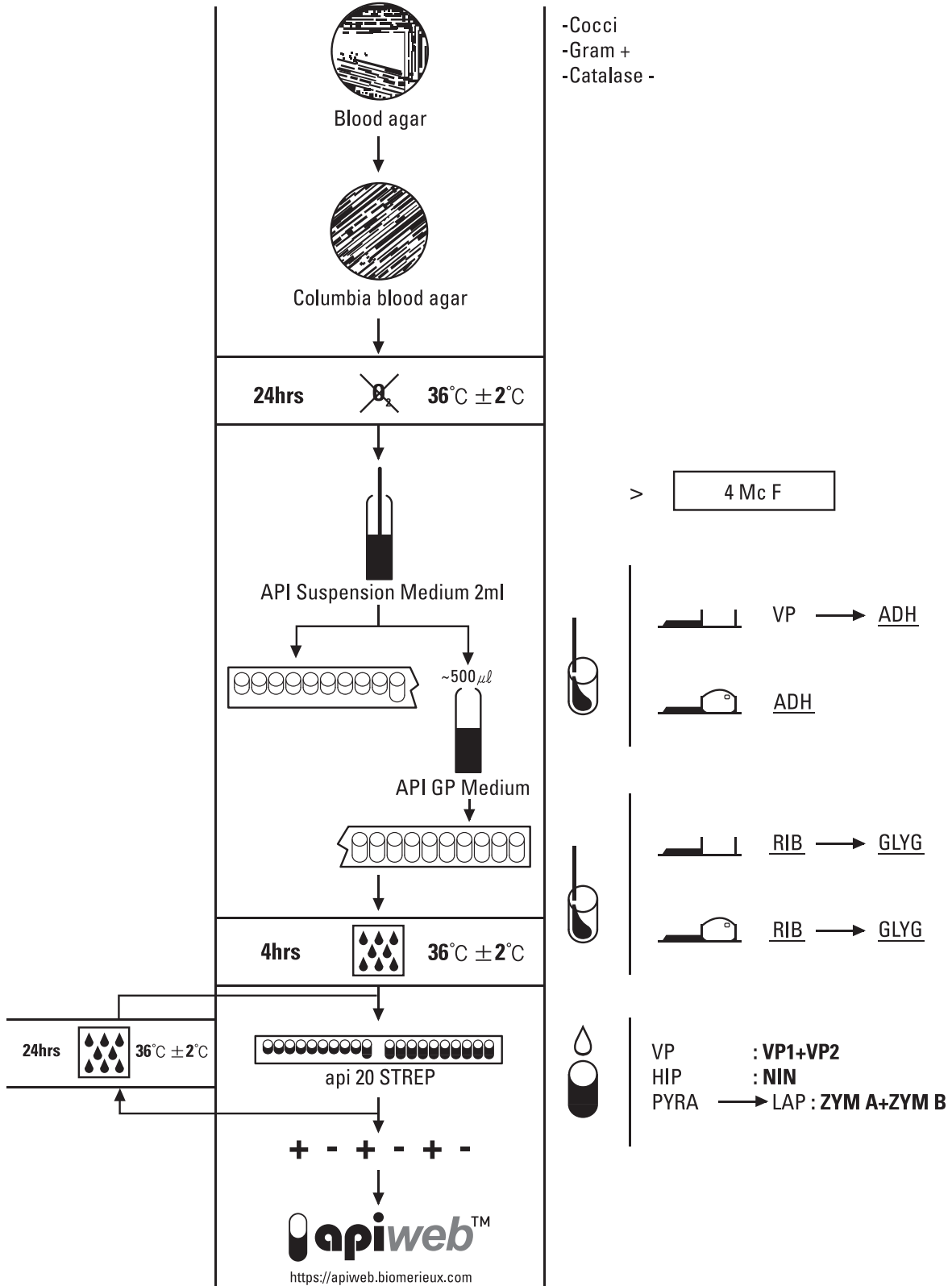
(1) 24시간 배양 후 2번째 reading 과정 중 ZYM A와 ZYM B reagent를 첨가했던 튜브에 침전이 보이는데 이것은 일반적인 현상이다.

(2) Starch의 Acidification은 종종 다른 당보다 약하게 일어난다.

(3) 10분 후 나타나는 pale pink는 음성으로 판별한다.

API 20 Strep | 연쇄상구균의 동정

검사방법



api[®] 20 Strep

READING / LECTURE - INTERPRETATION

Streptococcus equi ssp zooepidemicus ATCC 700400



Enterococcus gallinarum ATCC 700425



Streptococcus uberis ATCC 700407



Aerococcus viridans ATCC 700406



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

API 20 Strep | 연쇄상구균의 동정



API 20 Strep V7.0	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	βHEM
<i>Abiotrophia defectiva</i>	25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	98	100	5	92	99	0	0
<i>Aerococcus urinae</i>	3	99	24	12	0	52	41	50	92	28	28	0	32	13	56	64	1	1	40	0	0
<i>Aerococcus viridans 1</i>	13	50	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans 2</i>	15	70	50	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans 3</i>	22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloiococcus otitis</i>	0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	99	60	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>	100	43	100	97	32	2	76	1	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	99	46	99	97	1	0	21	4	99	92	98	1	98	92	92	100	0	1	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i>	94	43	99	95	42	1	89	1	97	93	85	70	78	18	84	98	15	10	60	3	1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	95	0	1	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>	25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Globicatella sanguinis</i>	4	40	98	40	52	16	100	0	9	0	76	95	71	47	76	100	71	95	100	90	0
<i>Granulicatella adiacens</i>	0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	98	25	41	1	23	0	18	4	88	0	27	0	17	0	97	30	0	15	25	0	0
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc spp</i>	91	1	60	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria spp</i>	97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis I</i>	99	1	100	1	34	2	1	0	100	0	0	1	97	1	100	100	65	98	98	98	1
<i>Streptococcus bovis II 1</i>	100	0	1	0	58	0	0	0	100	0	0	0	0	0	90	0	0	97	97	97	0
<i>Streptococcus bovis II 2</i>	100	2	100	0	89	97	99	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	72	31	5	0
<i>Streptococcus bovis II 3</i>	99	1	100	0	99	0	6	0	100	0	0	0	0	0	100	6	6	100	93	0	0
<i>Streptococcus bovis II 4</i>	98	1	100	0	97	2	10	0	100	1	1	32	1	1	98	40	84	99	99	97	0
<i>Streptococcus canis</i>	0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys.ssp dysgalactiae</i>	0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys.ssp equisimilis</i>	0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi ssp equi</i>	1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100
<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>	0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>	100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group L</i>	1	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis 1</i>	1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis 2</i>	0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	39	60	70	3	79	3	100	57	3	1	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>	100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	98
<i>Streptococcus salivarius</i>	85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	86	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	1	42	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis I</i>	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis II</i>	0	1	70	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>	99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	99	0	99	98	99	99	87	10	50	20	0

24 hrs (35~37° C)

API 20 Strep Ref. 20 600 : 25 strips + 25 media