

# API 20 E

## 장내세균 및 그람 음성간균의 동정

원리 .....	010
시약 .....	010
배지와 시약의 성분 .....	010
스트립과 배지의 보관 .....	010
시약의 보관 .....	010
시약의 이용 .....	010
사용상 주의사항 .....	011
실험방법 .....	011
사용한 재료의 처리 .....	012
제한점 .....	012
QC .....	012
판독표 .....	013
검사방법 .....	014
READING / LECTURE - INTERPRETATION .....	015
REF. 20 100 : 25 strips .....	016

# API 20 E | 장내세균 및 그람 음성간균의 동정

## 원리

- API 20 E 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 20개의 튜브로 되어 있다.
- 이 테스트 튜브들에 세균 부유액을 접종하고 배양시키면 배양 시간 동안 생성된 반응 산물들에 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 판독한다.

## 시약

### Kit 구성(25 테스트)

- API 20 E 25 strips
- 배양용 박스 25개
- 결과지 25장
- Package insert 1부
- Clip seal 1개

### 보조 시약(별도구매)

- API Suspension medium, 5ml (ref. 20 150) / API NaCl 0.85% Medium, 5ml(ref. 20 230)
- Reagent kit (ref. 20 120)  
[ TDA, JAMES, VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2 ] or  
날개포장 시약 : TDA (ref.70 402)  
JAMES (ref.70 542)  
VP 1 + VP 2 (ref.70 422)  
NIT 1 + NIT 2 (ref.70 442)
- Zn 시약 (ref.70 380)
- Oxidase test (ref.55 635)
- Mineral oil (ref.70 100)
- Identification software (*apiweb™*)
- PSIpettes (ref.70 250)

### 기타 보조 시약

- API OF medium (ref.50 110) : 발효 및 산화반응에 대한 테스트
- API M medium (ref.50 120) : 혐기성 미생물의 운동성 테스트

### 필요한 실험 기자재

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

## 배지와 시약의 성분

Suspension Medium 5 ml	Demineralized water	
TDA reagent 5 ml	Ferric chloride H <sub>2</sub> O	3.4 g qsp 100 ml
JAMES reagent 5 ml	Compound J 2183 (confidential) HCl 1N	0.5 g qsp 100 ml
VP 1 reagent 5 ml	Potassium hydroxide H <sub>2</sub> O	40 g 100 ml
VP 2 reagent 5 ml	α-naphthol Ethanol	6 g 100 ml
NIT 1 reagent 5 ml	Sulfanilic acid Acetic acid H <sub>2</sub> O	0.4 g 30 g 70 ml
NIT 2 reagent 5 ml	N,N-dimethyl-1-naphthylamine Acetic acid H <sub>2</sub> O	0.6 g 30 g 70ml
Zn reagent	Zinc dust	10g

## 스트립과 배지의 보관

스트립은 알루미늄 파우치에 흡습제와 함께 보관되어 있으므로 개봉 후 사용하지 않은 스트립은 clip seal을 이용하여 잘 밀봉해 두어야 한다. 사용 후 스트립은 2-8°C에서 보관하며 첫 개봉 후 10개월 까지 사용할 수 있다.

## 시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관한다 (TDA, VP1, NIT1 은 2-30°C에서 보관하고, Zn은 8-30°C에서 보관한다).

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

JAMES 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다.

## 시약의 이용

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



# API 20E | 장내세균 및 그람 음성간균의 동정

## 스트립의 판독

- 36°C ± 2°C에서 18-24시간 배양 후 판독표를 참조하여 결과를 읽는다.
- 결과지에 발생한 모든 결과를 기록한다.
- 만약에 glucose가 양성이거나 3개 이상의 테스트가 양성이면 보조시약을 첨가한다.
  - TDA test :TDA 시약을 한 방울 떨어뜨린 후 색깔이 노란색으로 변하면 양성으로 기록한다.
  - IND test :JAMES 시약을 한 방울 첨가 하고 바로 결과를 리딩한다. 큐플 전체가 분홍색으로 변하면 양성이다.
  - VP test : VP 1과 VP 2를 각각 한 방울씩 첨가하고 10분 기다린 후 결과를 리딩한다. 분홍색이나 빨간색이 양성이다. 10분 이후에 나타나는 열은 분홍색은 음성으로 간주한다.
  - Nitrites(NO<sub>2</sub>), N<sub>2</sub> gas(N<sub>2</sub>) : GLU tube에 NIT 1과 NIT 2시약을 한 방울씩 떨어뜨린 후 2-5분 기다린다. 빨간색은 양성(NO<sub>2</sub>)이고 노란색은 음성이다. 음성 반응은 nitrogen으로 환원에 의한 수도 있다 (간혹 bubble이 생김). 음성일 경우에 Zn을 2-3mg 떨어뜨리고 5분 후에 여전히 노란색으로 남아있으면 nitrogen(N<sub>2</sub>)으로 환원이고 분홍색이나, 빨간색으로 변하면 이는 tube에 여전히 남아 있던 nitrate(NO<sub>3</sub>)가 zinc에 의해서 환원되었음을 의미한다.

\* **NOTE** : nitrate 환원반응과 indole 생성 반응은 가장 마지막에 이루어져야 한다 (이 반응들은 gas를 생성함으로써 다른 반응들에 간섭 현상을 일으킴).

- 만약에 glucose가 음성이고 양성 반응이 3개 이하이면 보조시약을 첨가하지 말고 다음과 같이 진행한다.
  - API OF medium 2개의 앰플에 균을 접종하여 glucose의 대사과정을 확인한다.
  - MacConkey ager에 계대 배양 한다.
  - 운동성 Check :APIM Medium에 접종 혹은 현미경 관찰
  - 24시간 재 배양
  - 시약의 첨가
  - strip의 결과와 Supplementary test 결과를 Reading Table을 참조하여 결과지에 기록한다.

## 결과의 해석

- 발생된 반응은 numerical profile로 코드화되어 진다.

## QC

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

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
2	+	-	V	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	V	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	V	-	-	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V

- |  |            |  |            |
|--|------------|--|------------|
| 1. <i>Escherichia coli</i>             | ATCC 25922 | 4. <i>Proteus mirabilis</i>                    | ATCC 35659 |
| 2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | ATCC 51331 | 5. <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> | ATCC 35657 |
| 3. <i>Enterobacter cloacae</i>         | ATCC 13047 |  |            |

## 사용한 재료의 처리

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

## 제한점

- 간혹 *Klebsiella*나 *Proteus*같은 경우에는 glucose가 양성이었다가 음성으로 변환되는 경우도 있다. 예를 들어 bluish-green색으로 보인다. 이런 반응은 음성으로 기록하며 Identification Table을 참조한다.
- 각 스트립은 스트립 별 데이터 베이스에 없는 미생물을 동정하는데는 사용할 수 없다. *Salmonella* spp.와 *shigella* spp.의 경우에는 동정한 후 혈청학적인 확인이 필요하다.

## 판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
<u>ADH</u>	L - arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
<u>LDC</u>	L - lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>ODC</u>	L - ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
<u>H<sub>2</sub>S</u>	sodium thiosulfate	0.075	H <sub>2</sub> S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L- tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate yellow   reddish brown	
IND	L- tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate colorless   pink pale green / yellow	
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless   pink / red (5)	
<u>GEL</u>	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome - OXidase	(see oxidase test package insert)	

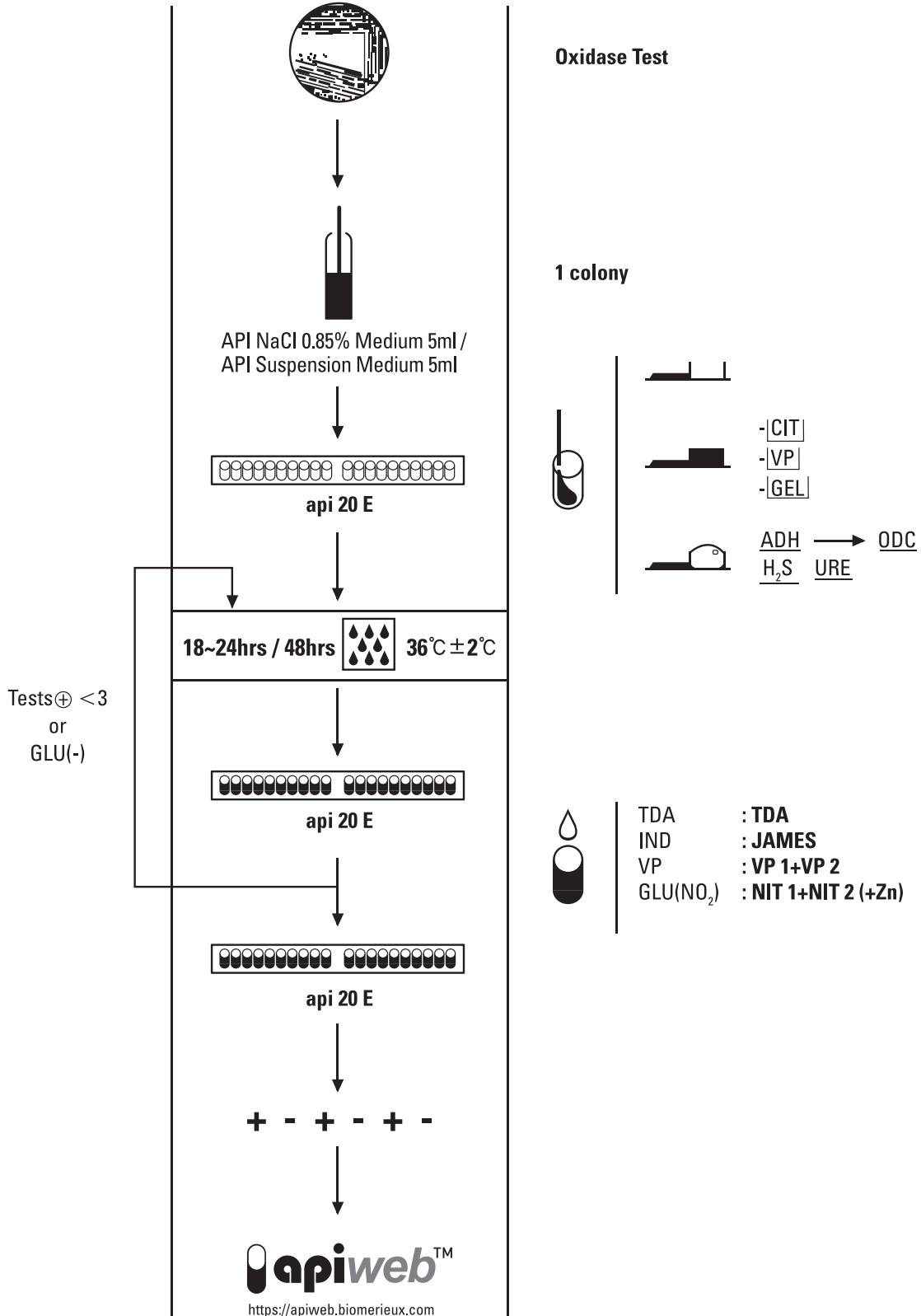
## SUPPLEMENTARY TESTS

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
Nitrate reduction GLU tube	potassium nitrate	0.076	NO <sub>2</sub> production reduction to N <sub>2</sub> gas	NIT 1 + NIT 2/2-5 min yellow   red	
				orange-red	Zn / 5 min yellow
MOB	API M Medium or microscope	-	motility	non-motile	motile
McC	MacConkey medium	-	growth	absence	presence
OF-F OF-O	glucose (API OF Medium)	-	fementation : under mineral oil oxidation : exposed to the air	green green	yellow yellow

(1) 열은 노랑색은 양성 (2) 36~48시간 배양 후 orange color는 음성 (3) 큐플에서 리딩(aerobic)  
 (4) 발효는 튜브의 아랫부분에서 시작됨, 산화는 큐플에서 시작됨 (5) 10분후의 열은 pink color는 음성으로 판정

# API 20 E 장내세균 및 그람 음성간균의 동정

## 검사방법

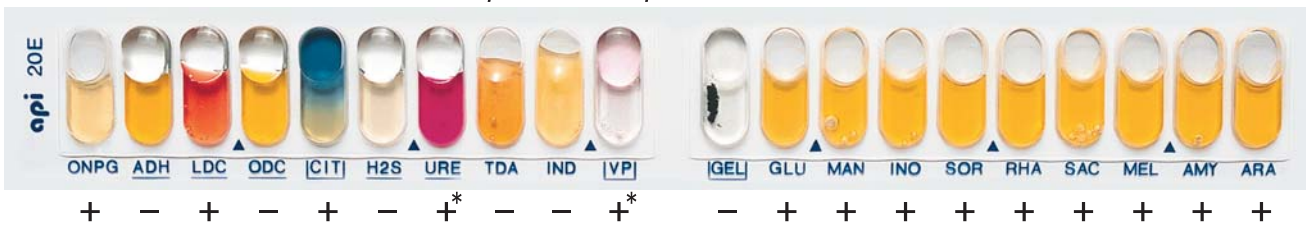




# api<sup>®</sup> 20 E

## READING / LECTURE - INTERPRETATION

### *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* ATCC 35657



### *Enterobacter cloacae* ATCC 13047



### *Proteus mirabilis* ATCC 35659



### *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 51331



### *Escherichia coli* ATCC 25922



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

