api® Manual

THE WAY FORWARD FOR BACTERIAL IDENTIFICATION

API Staph

staphylococci와 micrococci의 동정

원리 026
시약 026
배지와 시약의 성분 026
스트립과 배지의 보관 026
시약의 보관 026
시약의 이용 027
사용상 주의사항 027
실험방법 027
사용한 재료의 처리 028
QC 028
판독표 029
검사방법 030
READING / LECTURE - INTERPRETATION 031
REF. 20 500 : 25 strips + 25 media 032

API Staph | staphylococci와 micrococci의 동정

원리

- API Staph 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 각각의 microtube로 구성되어 있다.
- 이 테스트 튜브들에 세균 부유액을 접종하고 36℃± 2℃에서 18~24시간 동안 배양시키면 배양 시간 동안 생성된 반응 산물들에 의해 색이 변화되거나 보조 시약의 첨가로 색이 변화되며 이를 통해 결과를 판단한다.
- 배양 후 인터넷 사이트 api*web*™ (https://apiweb.biomerieux.com)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

시약

Kit 구성(25 테스트)

- API Staph 25 strips
- 배양용 박스 25개
- API Staph medium 25 ampules
- 결과지 25장
- Package insert 1부

보조 시약(별도구매)

- Reagent kit : ZYM A (ref.70 494)
  ZYM B (ref.70 493)
  VP 1 + VP 2 (ref.70 422)
  NIT 1 + NIT 2 (ref.70 442)
- Mineral oil (ref.70 100)
- McFarland Standard (ref.70 900)
- Identification software (api*web*™)
- PSIpettes (ref.70 250)

필요한 실험 기자재

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

배지와 시약의 성분

API Staph Medium 6 ml	Yeast extract Bactopeptone (bovine/porcine origin) NaCl Trace elements Demineralized water pH : 7.0 - 7.4	0.5 g 10 g 5 g 10 ml qsp 1000 ml
VP 1 reagent 5 ml	Potassium hydroxide H_2O	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_2O	0.4 g 30 g 70 ml
NIT 2 reagent 5 ml	N, N - dimethyl - 1 - naphthylamine Acetic acid H_2O	0.6 g 30 g 70 ml
ZYM A reagent 8 ml	Tris-hydroxymethyl-aminomethane Hydrochloric acid (37%) Sodium lauryl sulfate H_2O	25 g 11 ml 10 g 100 ml
ZYM B reagent 8 ml	Fast Blue BB 2-methoxyethanol	0.35 g 100 ml

스트립과 배지의 보관

스트립과 배지는 2~8℃ 암소에서 보관하여 포장에 명시된 유효 기간까지 사용할 수 있다.

시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2 ~ 8℃의 암소에서 보관 한다. (VP 1, NIT 1, ZYM A은 2~30℃에서 보관한다.)
ZYM B 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고 안에서 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다.
ZYM B 시약은 노란색이다. 만약 시약이 pink색으로 바뀌면 폐기한다. 2~8℃에서 ZYM A 시약은 침전이 보이지만 실온에 두면 없어지며 결과에는 영향을 미치지 않는다.

시약의 이용

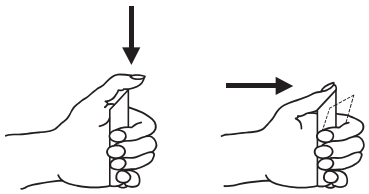
다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20~30℃)에 꺼내 둔다.

(1) VP1, VP2, ZYM A, ZYM B reagents
앰플을 열고 시약 한 방울을 버린 후 사용한다.

(2) NIT1, NIT2 reagent
앰플을 열고 시약 한 방울을 버린 후 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 꾹 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 - Laest 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

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

- 혈액배지에서 균주를 36℃± 2℃, 18~24시간 배양한다.
- 집락 모양과 그람염색, Catalase 시험으로 *Micrococcaceae* family를 구분하고 순수하게 분리 배양한다 .
- 순수분리 배양한 균주를 API staph Medium에 넣어 0.5 McFarland의 탁도를 맞춘다.

스트립의 접종

- 접종할 API Staph Medium은 PSIpettes을 이용하여 기포가 생기지 않게 조심스럽게 튜브까지만 채운다.
- ADH, URE는 혐기적인 조건을 만들어 주기 위해 광유(mineral oil)로 큐플을 채운다.
- 스트립 위에 뚜껑을 덮고 36℃± 2℃, 18~24시간 동안 호기적인 상태에서 배양한다.

* TIP 

스트립의 판독

- 다음 테스트의 각각의 시약을 한 방울씩 첨가한다.
  – **VP test** : VP 1과 VP 2 시약을 한방울씩 첨가하고 10분간 기다린 후 violet-pink는 양성이다. 10분후에 나타나는 pale pink나 light pink는 음성이다.
  – **NIT test** : NIT 1와 NIT 2 시약을 한방울씩 첨가하고 10분이 지난 후 빨간색이면 양성이다.
  – **PAL test** : ZYM A와 ZYM B 시약을 한방울씩 첨가하고 10분 기다린 후 보라색이면 양성이다.
- 결과지에 발생한 모든 결과를 기록한다.
- 18~24 시간 배양 후 판독표를 참조하여 결과를 읽는다.

API Staph | staphylococci와 micrococci의 동정

결과의 해석

- 발생된 반응은 numerical profile로 코드화되어 진다.
- 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)
- API Staph는 20개의 테스트로 구성되어 있으나, lysostaphin(200㎍/㎖)에 저항성있는 Micrococci는 21번째 테스트로 양성이면 4의 값을 가진다.

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.

	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
1	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	V	−	+	+	−	+	−	+
2	−	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	−	−
3	−	+	+	+	−	−	−	V	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−

1. *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404
2. *Staphylococcus lentus* ATCC 700403
3. *Staphylococcus capitis* ATCC 35661

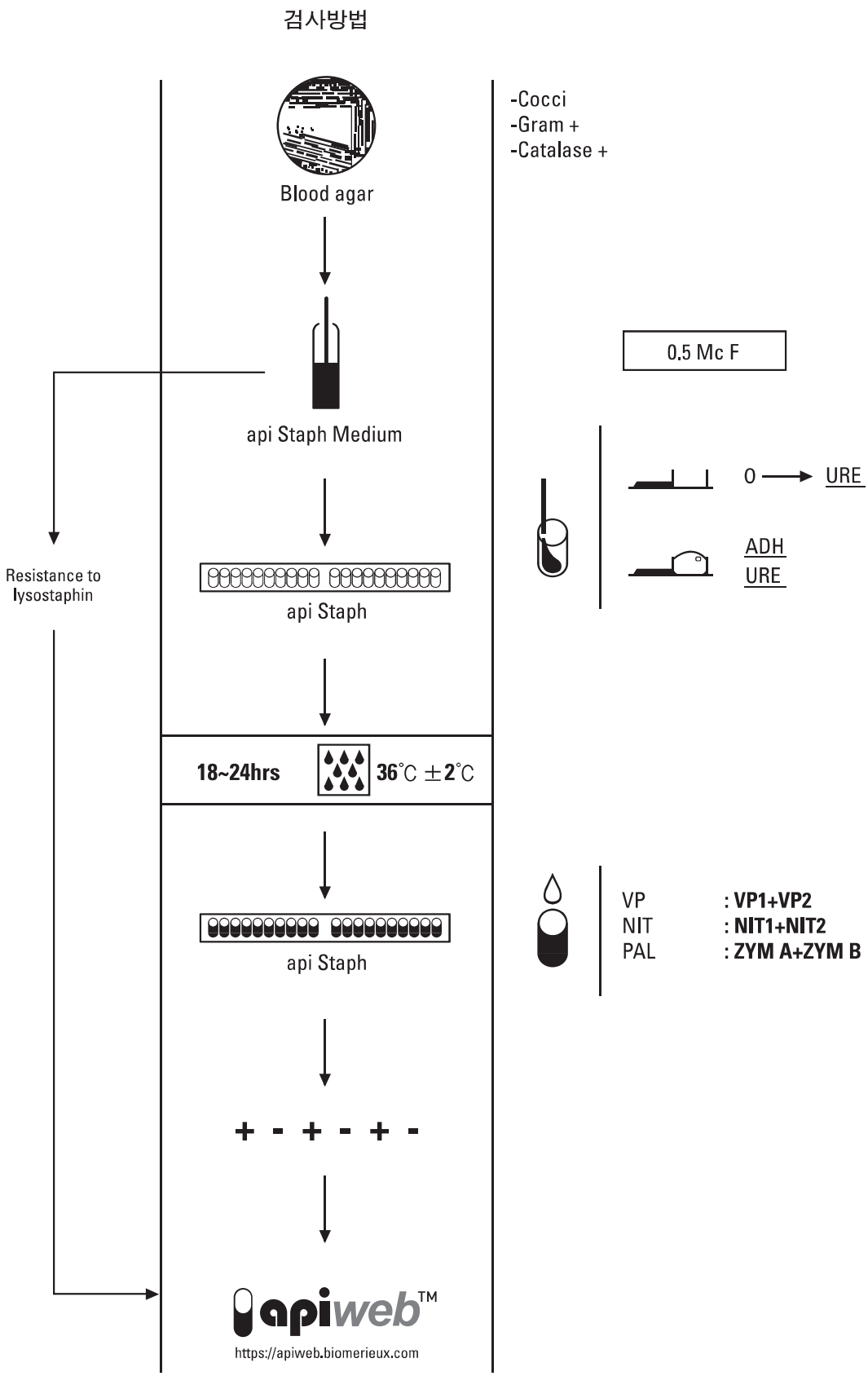
판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
0	No substrate		Negative control	red	-
GLU	D-glucose	1.56	(Positive control) (D-GLUcose)	red *	yellow
FRU	D-fructose	1.4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1.4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1.4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4	acidification (LACtose)		
TRE	D-trehalose	1.32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1.36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1.4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-melibiose	1.32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	potassium nitrate	0.08	Reduction of NITrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 min colorless-light pink	 red
PAL	β-naphthyl phosphate	0.0244	ALkaline Phosphatase	ZYM A + ZYM B / 10 min yellow	 violet
VP	sodium pyruvate	1.904	Acetyl-methyl-carbinol production (Vodes Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless - light pink	 violet-pink
RAF	D-raffinose	1.56	acidification (RAF finose)	red	yellow
XYL	D-xylose	1.4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose (sucrose)	1.32	acidification (SACcharose)		
MDG	methyl-αD-glucopyranoside	1.28	acidification (Methly - αD -Glucopyranoside)		
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	acidification (N-Acetyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1.904	Arginine DiHydrolase	yellow	orange-red
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red-violet

acidification test 는 negative(0)와 positive(orange color) orange color과 비교해야 함

* MNE와 XLT 다음 테스트가 양성이면, 오렌지색의 MNE, XLT 결과는 음성으로 간주한다.

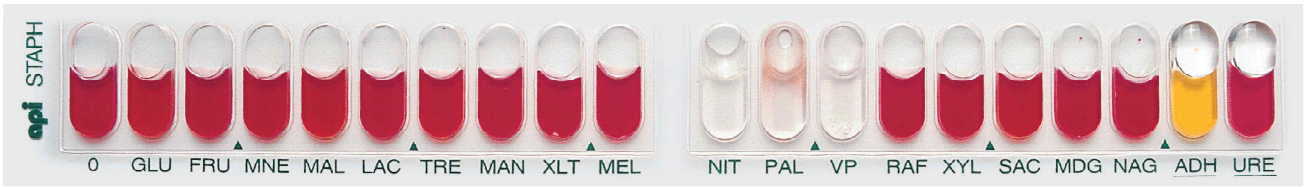
API Staph | staphylococci와 micrococci의 동정



api® Staph

READING / LECTURE - INTERPRETATION

Micrococcus spp ATCC 700405



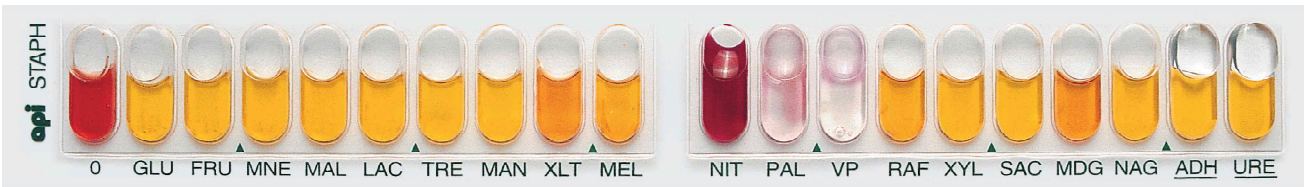
− − − − − − − − − − − ±* − − − − − − − +

Staphylococcus xylosus ATCC 700404



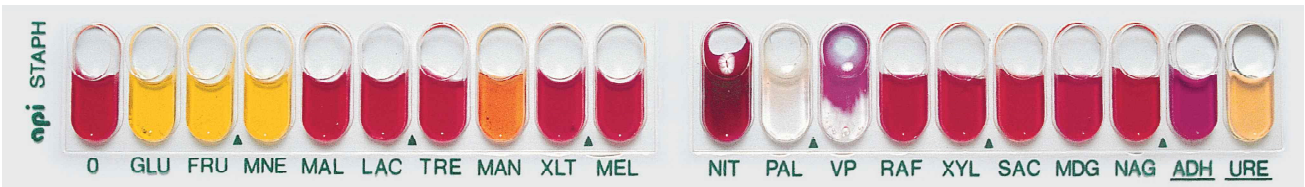
− + + + + + + + + − + + −* − + + − + − +

Staphylococcus lentus ATCC 700403



− + + + + + + + ±* + + ±* ±* + + + ± + − −

Staphylococcus capitis ATCC 35661



− + + + − − − ±* − − + − + − − − − − + −

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

API Staph | staphylococci와 micrococci의 동정



API Staph V4.1	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
Staphylococcus aureus	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
Staphylococcus auricularis	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
Staphylococcus capitis	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
Staphylococcus caprae	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
Staphylococcus carnosus	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
Staphylococcus chromogenes	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
Staphylococcus cohnii ssp cohnii	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
Staph.cohnii ssp urealyticum	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
Staphylococcus epidermidis	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
Staphylococcus haemolyticus	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
Staphylococcus hominis	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
Staphylococcus hyicus	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
Staphylococcus lentus	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
Staphylococcus lugdunensis	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
Staphylococcus saprophyticus	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
Staphylococcus schleiferi	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
Staphylococcus sciuri	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
Staphylococcus simulans	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
Staphylococcus warneri	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
Staphylococcus xylosus	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
Kocuria kristinae	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
Kocuria varians/rosea	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
Micrococcus spp	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91

24 hrs (35~37° C)

API Staph Ref. 20 500 : 25 strips + 25 media