

# API 50 CHB/E Medium

## 바실러스의 동정 / 장내세균의 동정용 배지

원리 .....	098
시약 .....	098
배지와 시약의 성분 .....	098
배지의 보관 .....	098
사용상 주의사항 .....	098
실험방법 .....	099
사용한 재료의 처리 .....	100
QC .....	101
스트립의 성분표 .....	101
바실러스 검사방법 .....	102
장내 세균의 검사방법 .....	103
REF. 50 430 .....	104

# API 50 CHB/E Medium | 바실러스의 동정/장내세균의 동정용 배지

## 원리

- API 50 CHB/E는 바실러스 와 장내세균 비브리오 등의 동정을 위한 ready to use type의 배지로서 API 50 CH 스트립에 있는 49가지의 탄수화물의 발효 여부를 연구하는데 사용된다 .
- 동정하고자 하는 균체를 배지에 풀어 균액을 만든 후 스트립에 분주하고 배양하면, 배양 기간 동안 발효된 탄수화물이 산을 생성하고 pH를 떨어뜨린다. 배지에는 pH indicator가 들어 있어서 색의 변화로 양성, 음성을 판독한다.
- API 20 E 스트립이 API 50 CH의 결과를 보완하기 위해 사용될 수 있다. (바실러스의 경우에는 옵션, 장내 세균의 경우에는 필수)

## 시약

### Kit 구성(10 테스트)

- API 50 CHB/E Medium 10 ampules
- Package insert 1부

### 보조 시약(별도구매)

#### for *Bacillus*

- API 50 CH strip (ref. 50 300)
- API 20 E strip (ref. 20 100)
- API 20 E reagent kit (ref. 20 120)
- Identification software (apiweb™)
- Mineral oil (Ref. 70 100)
- API NaCl 0.85% Medium, 5 ml (Ref. 20 230)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) or DENSIMAT (Ref. 99 234)

#### for *Enterobacteriaceae and Vibrionaceae*

- API 50 CH strip (ref. 50 300)
- API 20 E strip (ref. 20 100)
- API 20 E reagent kit (ref. 20 120)
- Identification software (apiweb™)
- Mineral oil (Ref. 70 100)
- API Suspension Medium, 5 ml (Ref. 20 150)
- McFarland Standard (Ref. 70 900) or DENSIMAT (Ref. 99 234)

### 필요한 실험기자재

- Incubator (20 °C, 30 °C, 37 °C, 55 °C)
- Refrigerator
- Bunsen burner
- Marker pen

## 배지와 시약의 성분

API 50 CHB/E Medium 10 ml	Ammonium sulphate Yeast extract Tryptone (bovine/porcine origin) Disodium phosphate Monopotassium phosphate Trace elements Phenol red Deminerlized water Ph 7.4-7.8 at 20-25 °C	2 g 0.5 g 1 g 3.22 g 0.12 g 10 ml 0.17 g 1000ml
NaCl 0.85% Medium 5 ml	Sodium chloride Deminerlized water	8.5 g 1000ml
Suspension Medium 5 ml	Deminerlized water	

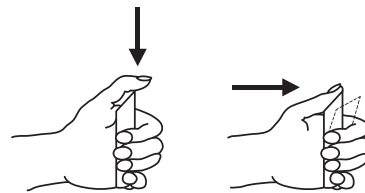
API 20 E reagents : API 20 E 설명서를 참조

## 배지의 보관

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

## 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 꺾는다.
- 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 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

### 바실러스의 경우

#### 균체의 준비

- 균주가 순수 분리되었는지 확인한다.
- Bacillus 속의 기본적인 속성과 일치하는지 확인한다. (호기성, 포자형성, 간균, 그람양성)
- Nutrient agar에서 키운다.
  - 만약 미생물의 생육 최적 온도를 확실히 모를 경우에는 몇개의 plate로 여러 온도에서 배양한다.
  - 성장 속도가 느린 미생물의 경우에는 충분한 양의 균체를 확보하기 위해서 2개의 plate를 만든다.
  - 25-45°C에서 성장하는 중온성 미생물은 16-18시간 동안 배양한다.
  - 20°C에서 성장하는 저온성 미생물은 18-48시간 동안 배양한다.
  - 55°C에서 성장하는 고온성 미생물은 12-16시간 동안 배양한다.
- Bacillus lentus의 배양시에는 nutrient agar를 멸균하기 전에 1L당 1g의 urea를 첨가하면 균의 성장에 도움이 된다.


#### 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

- DENSIMAT를 사용할 경우
  - API 50 CHB/E medium의 뚜껑을 연다.
  - 동일한 집락을 여러개 취해서 2 McFarland로 탁도를 맞춘다.
  - API 20E 접종액으로는 NaCl 0.85%(5ml) 에 2 McFarland로 탁도를 맞춘다.
- DENSIMAT를 사용하지 않을 경우
  - Sterile Saline(1ml) 앰플을 개봉한다.
  - 면봉을 이용하여 heavy suspension (매우 탁도가 진한 균액)을 만든다.
  - NaCl 0.85%(5ml)에 위 균액을 몇(n) 방울 떨어뜨려서 탁도를 2 McFarland로 맞춘다.
  - API 50 CHB/E medium 10ml에 2n방울의 진한 균액을 넣으면 2 McFarland가 된다.

\* TIP  큐플 튜브

#### 스트립의 접종

- 탁도를 맞춘 API 50 CHB/E medium을 스트립의 튜브에 분주한다. [주의] 절대 호기성균을 제외하고는 mineral oil를 첨가하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있다.
- API 20 E 뒷부분의 8가지 테스트는 API 50 CH와 일치하기 때문에 앞부분의 12가지 테스트 튜브에만 균액을 채운다. (이 중 GLU는 NIT 결과를 보기 위함)

#### 스트립의 배양

- 55°C ± 2°C에서 성장하는 고온성 바실러스의 경우에는 3시간, 6시간, 그리고 24시간 동안 배양하며, 튜브를 윗쪽으로 약간 기울여 돔으로써 생성되는 기체가 방출되도록 한다.
- 29°C ± 2°C에서 성장하는 바실러스는 24시간, 48시간 동안 배양한다.
- API 20E의 경우에도 동일한 배양 시간을 적용시킨다.

#### 스트립의 판독

- 결과는 2-3번씩 리딩 하도록 한다.
  - 고온성 바실러스는 3시간, 6시간, 24시간 배양 후
  - 그 외의 바실러스는 24시간, 48시간 배양 후
- API 50 CH 스트립
  - 배지에 포함되어 있는 phenol red 지시약에 의해 산이 생성되었을 경우 노란색으로 결과가 나타난다.
  - Esculin test (tube no.25)은 빨강색에서 검은색으로 색이 변하면 양성이다.

\* NOTE : 1차 리딩에서 양성이었던 튜브가 2차 리딩 시 음성으로 나타나면 양성으로 결과를 판독해야 한다. (이런 역반응은 peptone으로부터 생성된 암모니아에 의해 알칼리로 바뀌기 때문이다.)

# API 50 CHB/E Medium | 바실러스의 동정/장내세균의 동정용 배지

- API 20 E 스트립
  - 보조시약은 마지막 리딩 전에 첨가한다.
  - 11가지 테스트 결과와 GLU 튜브에서의 NIT 반응은 최종 결과 해석을 위해 기록한다.

## 결과의 해석

- 실험 결과 얻어지는 생화학적 결과는 [apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com)(<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 해석되거나 균주 특성 실험을 위한 자료로 사용되거나 다른 균주의 특성과 비교 되어지는데 사용할 수 있다.

### 장내세균의 경우

## 균체의 준비

- 균주가 순수 분리되었는지 확인한다.
- 영양 한천 배지에서 37°C에서 18-24시간 동안 배양한다.  
(ex. Trypcase soy agar )
- 이 균이 *Enterobacteriaceae* 또는 *Vibrionaceae* 에 속하는 균주인지 확인한다

## 스트립의 준비

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

## 접종액의 준비

- DENSIMAT를 사용할 경우
  - API 50 CHB/E medium의 뚜껑을 연다.
  - 동일한 집락을 여러개 취해서 0.5 McFarland로 탁도를 맞춘다.
- DENSIMAT를 사용하지 않을 경우
  - 멸균된 saline 용액 1ml가 든 tube를 준비한다.
  - 몇 개의 집락을 취해서 4 McFarland로 탁도를 맞춘다.
  - 위 균액을 API 50 CHB/E medium에 넣는다.
  - 정확한 동정 결과를 위해 API 20E도 사용하도록 한다.

## 스트립의 접종

- 탁도를 맞춘 API 50 CHB/E medium을 스트립의 튜브에 분주하고 모든 튜브에 mineral oil를 첨가한다.
- API 20 E는 앞부분의 11가지 테스트 튜브에만 균액을 채운다.  
(이 중 GLU는 NIT 결과를 보기 위함)

## 스트립의 배양

- 36°C ± 2°C에서 24-48시간 동안 호기적으로 배양한다.

## 스트립의 리딩

- 24시간, 48시간 동안 배양 후 결과를 리딩한다.
- API 50 CH 스트립
  - 배지에 포함되어 있는 phenol red 지시약에 의해 산이 생성되었을 경우 노란색으로 결과가 나타난다.
  - Esculin test (tube no.25)은 빨강색에서 검은색으로 색이 변하면 양성이다.

\* **NOTE** : 1차 리딩에서 양성이었던 튜브가 2차 리딩에서 음성으로 나타나면 양성으로 결과를 판독해야 한다.(이런 역반응은 peptone으로부터 생성된 암모니아에 의해 배지가 알칼리성이 되기 때문이다.)

- API 20 E 스트립
  - 보조시약은 마지막 리딩 전에 첨가한다.
  - 11가지 테스트 결과를 최종 결과 해석을 위해 기록한다.

## 결과의 해석

- 실험 결과 얻어지는 생화학적 결과는 [apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com)에 접속하여 해석하거나 균주 특성 실험을 위한 자료로 사용되거나 다른 균주의 특성과 비교 되어지는데 사용할 수 있다. ([apiweb™](https://apiweb.biomerieux.com) 주소 : <https://apiweb.biomerieux.com>)

### 사용한 재료의 처리

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

**QC**

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

For Bacillus

1. *Bacillus polymyxa* (\*) ATCC 43865

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
24	-	+	-	-	+	+	+	-	-	V	+	+	+	+	-	V	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	V	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(\*) *Bacillus polymyxa* 는 API 50 CHB/E 에서 *Paenibacillus polymyxa*로 동정됨.

For Enterobacteriaceae

1. *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* ATCC 35657  
 2. *Providencia alcalifaciens* ATCC 9886

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
1	24	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-		
	48	-	+	-	V	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V	-	-	-	+	+	-	+	+	-	
2	24	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48	-	V	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

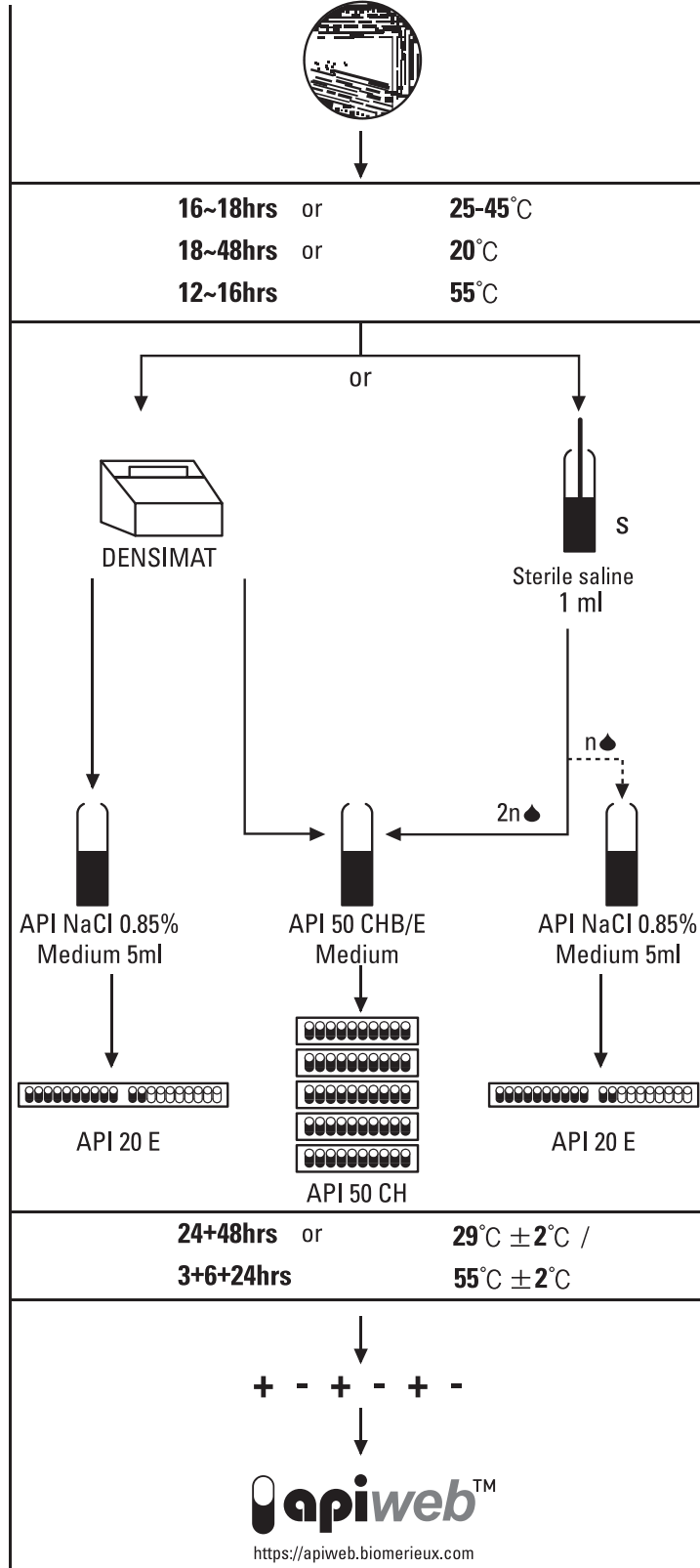
**스트립의 성분표**

STRIP 0-9 Tube/substrate	STRIP 10-19 Tube/substrate	STRIP 20-29 Tube/substrate	STRIP 30-39 Tube/substrate	STRIP 40-49 Tube/substrate
0 CONTROL	10 GALactose	20 Methyl- $\alpha$ ,D-Mannopyranside	30 MELibiose	40 D-TURanose
1 GLYceroll	11 GLUcose	21 Methyl- $\alpha$ ,D-Glucoside	31 Sucrose	41 D-LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acethyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D-TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D-FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L-FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFfinose	45 D-ARAbitol
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L-ARAbitol
7 L XYLose	17 INOSitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGen	47 GlucoNaTe
8 ADONitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiToI	48 2-keto-Gluconate
9 Methyl-B-D-Xylopyranside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENtiobiose	49 5-keto-Gluconate

# API 50 CHB/E Medium

바실러스의 동정 / 장내세균의 동정용 배지

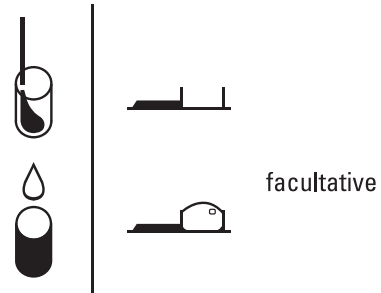
## 바실러스 검사방법



Bacillus and related genera

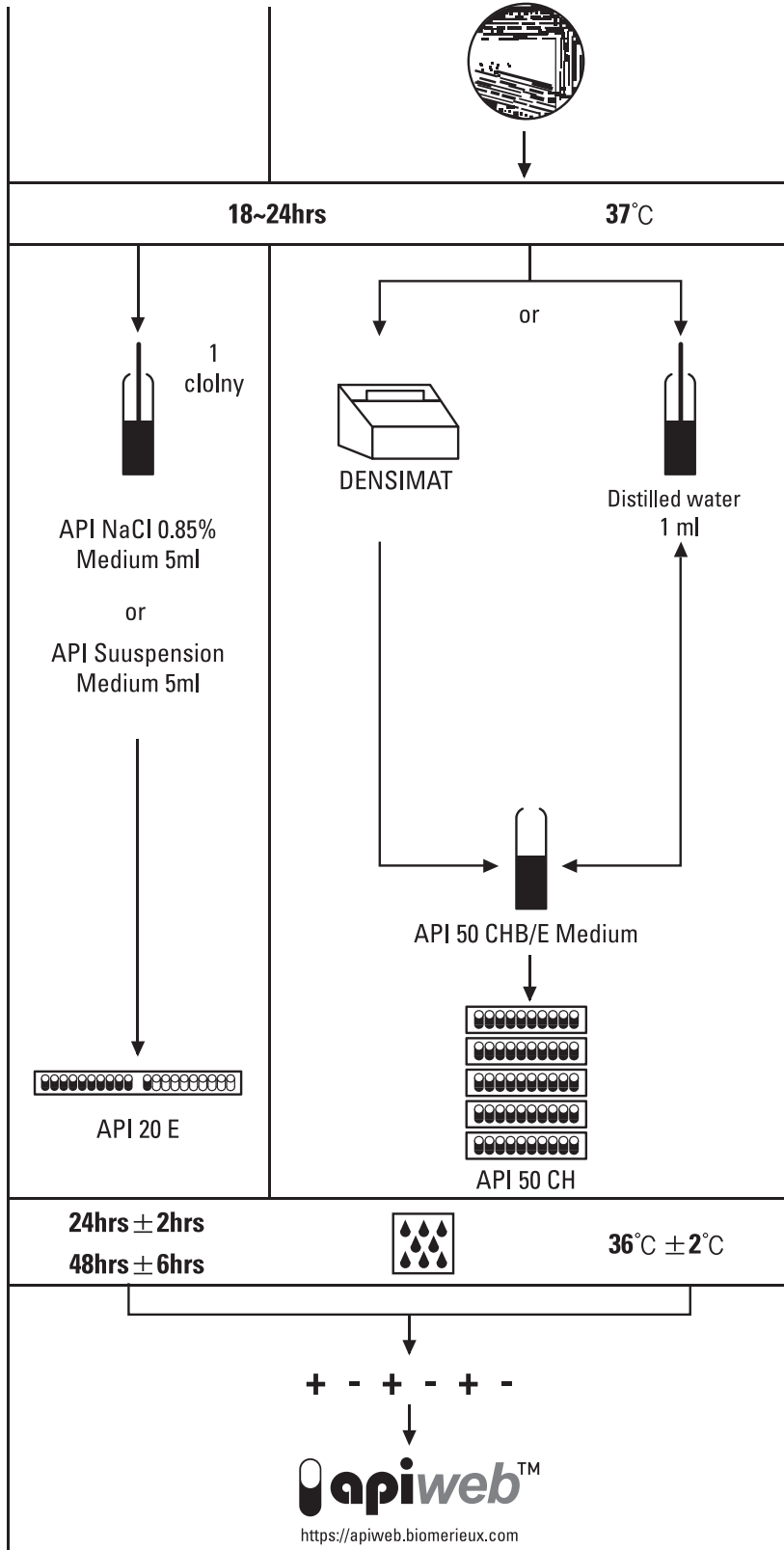
All the culture

2 Mc F



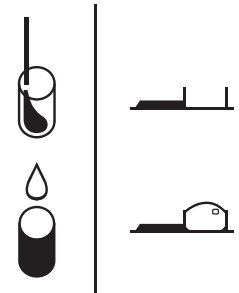
API 20 E | TDA : TDA  
 IND : JAMES  
 VP : VP 1+VP 2  
 GLU(NO<sub>2</sub>) : NIT 1+NIT 2(+Zn)

장내 세균의 검사방법



4 McF

0.5 McF



API 20 E

TDA : TDA  
IND : JAMES (IND)  
VP : VP 1+VP 2  
GLU(NO<sub>2</sub>) : NIT 1+NIT 2(+Zn)

API CHB/E Medium  
 바실라리스의 동정/장내 세균의 동정을 배지







