

# API 20 NE

## 장내세균 이외의 그람 음성간균의 동정

|  |     |
|--|-----|
| 원리 .....                                 | 018 |
| 시약 .....                                 | 018 |
| 배지와 시약의 성분 .....                         | 018 |
| 스트립과 배지의 보관 .....                        | 018 |
| 시약의 보관 .....                             | 018 |
| 시약의 이용 .....                             | 019 |
| 사용상 주의사항 .....                           | 019 |
| 실험방법 .....                               | 019 |
| 사용한 재료의 처리 .....                         | 020 |
| 제한점 .....                                | 020 |
| QC .....                                 | 020 |
| 판독표 .....                                | 021 |
| 검사방법 .....                               | 022 |
| READING / LECTURE - INTERPRETATION ..... | 023 |
| REF. 20 050 : 25 strips + 25 media ..... | 024 |

# API 20 NE | 장내세균 이외의 그람 음성간균의 동정

## 원리

- API 20 NE 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 인터넷사이트 *apiweb™* (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

## 시약

### Kit 구성(25 테스트)

- API 20 NE 25 strips
- 배양용 박스 25개
- API AUX Medium 앰플 25개
- 결과지 25장
- Package insert 1부

### 보조 시약(별도구매)

- API NaCl 0.85% medium, 2ml (ref.20 070)
- Reagent kit : JAMES (ref. 70 542)
  - NIT 1 + NIT 2 (ref. 70 442)
  - Zn (ref. 70 380)
- Oxidase (ref. 55 635)
- Mineral oil (ref. 70 100)
- McFarland Standard (ref. 70 900)
- Identification software (*apiweb™*)
- PSIpettes (ref. 70 250)

### 필요한 실험 기자재

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

## 배지와 시약의 성분

|                               |   |  |
|-------------------------------|---|--|
| NaCl 0.85 %<br>Medium<br>2 ml | Sodium chloride<br>Deminerlized water   | 8.5 g<br>1000 ml   |
| API AUX<br>Medium<br>7 ml     | Ammonium sulphate<br>Agar<br>Vitamin solution<br>Trace elements<br>Monosodium phosphate<br>Potassium chloride<br>Deminerlized water to make<br>Final pH : 7.0-7.2 | 2 g<br>1.5 g<br>10.5 ml<br>10 ml<br>6.24 g<br>1.5 g<br>1000 ml |
| JAMES reagent<br>5 ml         | Compound J 2183 (confidential)<br>HCl 1N  | 0.5 g<br>qsp 100 ml  |
| NIT 1 reagent<br>5 ml         | Sulfanilic acid<br>Acetic acid<br>H <sub>2</sub> O  | 0.4 g<br>30 g<br>70 ml   |
| NIT 2 reagent<br>5 ml         | N, N-dimethyl-1-naphthylamine<br>Acetic acid<br>H <sub>2</sub> O  | 0.6 g<br>30 g<br>70 ml   |
| Zn reagent<br>10 g            | Zinc dust   |  |

## 스트립과 배지의 보관

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

## 시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관 한다 (NIT 1은 2-30°C에서 보관하고, Zn은 8-30°C에서 보관한다).

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

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

## 시약의 이용

다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30℃)에 꺼내 둔다.

### (1) NIT1, NIT2 reagent

앰플을 열고 시약 한 방울을 버린 후 사용한다.

### (2) JAMES 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.

\* **NOTE**: Jame 시약은 연한 노란색일때만 사용이 가능하다. 색이 변하면 사용하지 않는다.

### (3) Zn reagent

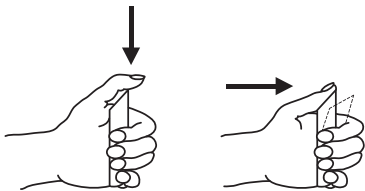
병뚜껑을 열고 약 2-3mg의 파우더를 덜어서 테스트하고자 하는 큐플에 넣는다. 뚜껑을 조심스럽게 닫고 보관한다.

### (4) Oxidase test

- Colony를 백금이로 따서 Whatman이나 paper disc에 균을 묻힌다.
- Oxidase 시약 ampoule을 깨서 시약 한 방울을 균위에 떨어 뜨린다.
- 30초~1분 사이에 보라색으로 변하면 양성 결과로 기록한다.

## 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 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.

- 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

### 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

- NaCl 0.85% medium (2ml)의 앰플을 열고 PSlpette으로 배지에서 1-4개의 동일한 집락을 선택한 후 혼탁도를 0.5 McFarland로 맞춘다.
- \* **NOTE** : 0.5 McFarland의 혼탁도를 맞추는 것이 매우 중요하다.

### 스트립의 접종

- NO<sub>3</sub> 에서 PNPg 까지 세균 부유액을 기포가 생기지 않게 튜브까지 채운다.
- API AUX Medium을 개봉하고 만들어 둔 접종액 200μl를 넣고 잘 섞는다.
- API AUX Medium을 [GLU]에서 [PAC]까지 큐플과 튜브에 가득 채운다.
- **GLU**, **ADH**, **URE** 는 혐기적인 조건을 만들어 주기 위해 광유(mineral oil)로 큐플을 채운다.
- 스트립 위에 뚜껑을 덮는다.
- 29℃ ± 2℃에서 24시간 동안 호기적인 상태에서 배양한다.

\* **TIP**  큐플 튜브

# API 20 NE | 장내세균 이외의 그람 음성간균의 동정

## 스트립의 판독

- 29°C ± 2°C에서 24시간 배양 후 판독표를 참조하여 결과를 읽는다.
- 결과지에 발생한 모든 결과를 기록한다.  
발생 되어진 반응을 결과지에 기록한다.  
(GLU, ADH, URE, ESC, GEL 과 PNPG)  
NO<sub>3</sub>와 TRP test는 assimilation test 결과를 리딩한 후에 시약을 첨가하여 결과를 판독한다.
- **NO<sub>3</sub> test** : NO<sub>3</sub> 큐플에 NIT 1과 NIT 2 시약을 한 방울씩 떨어뜨린 후 5분후에 빨간색은 양성이고 노란색은 음성이다. 음성 반응은 nitrogen으로의 환원에 의할 수도 있다. 음성일 경우에 Zn을 2-3mg 떨어뜨리고 5분 후에 무색으로 남아 있으면 양성이 된다. 큐플이 pink-red가 되면 반응은 음성이고 이는 nitrate가 tube에 존재하고 zinc에 의해 nitrate가 환원 된 것이다.
- **TRP test** : JAMES 시약을 한 방울을 첨가한다. 반응은 즉시 일어나며 분홍색이면 양성이다.
- **Assimilation tests** : 불투명한 큐플은 양성반응을 나타내고 불확실하게 자랐을 경우는 다른 test의 탁도와 비교하여 + 또는 ±으로 기록한다. "IDENTIFICATION NOT VALID BEFORE 48-HR INCUBATION"와 같은 경우에는 NIT 1, NIT 2와 JAMES 시약을 제거하고 NO<sub>3</sub>와 TRP에 광유를 넣는다. 그리고 29°C ± 2°C에 24시간 동안 재배양하고 NO<sub>3</sub>, TRP와 GLU를 제외하고 다시 판독한다.

## 결과의 해석

- 발생한 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 폐기처분한다.

### 제한점

- api 20 NE는 배양조건이 까다롭지 않은 non-enteric Gram 음성간균의 동정에 사용한다.
- 순수 분리된 단일 colony만 사용한다.

## QC

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

|   | NO <sub>3</sub> | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA | IMNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC | OX |
|---|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 1 | -               | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +    | +   | +   | -    | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 2 | +               | +   | +   | +   | -   | +   | +   | +    | +   | +   | +    | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | +  |
| 3 | +               | -   | -   | V   | V   | -   | +   | -    | +   | -   | -    | +   | +   | -   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | +  |
| 4 | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -    | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | +  |

1. *Sphingobacterium multivorum* ATCC 35656
2. *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654

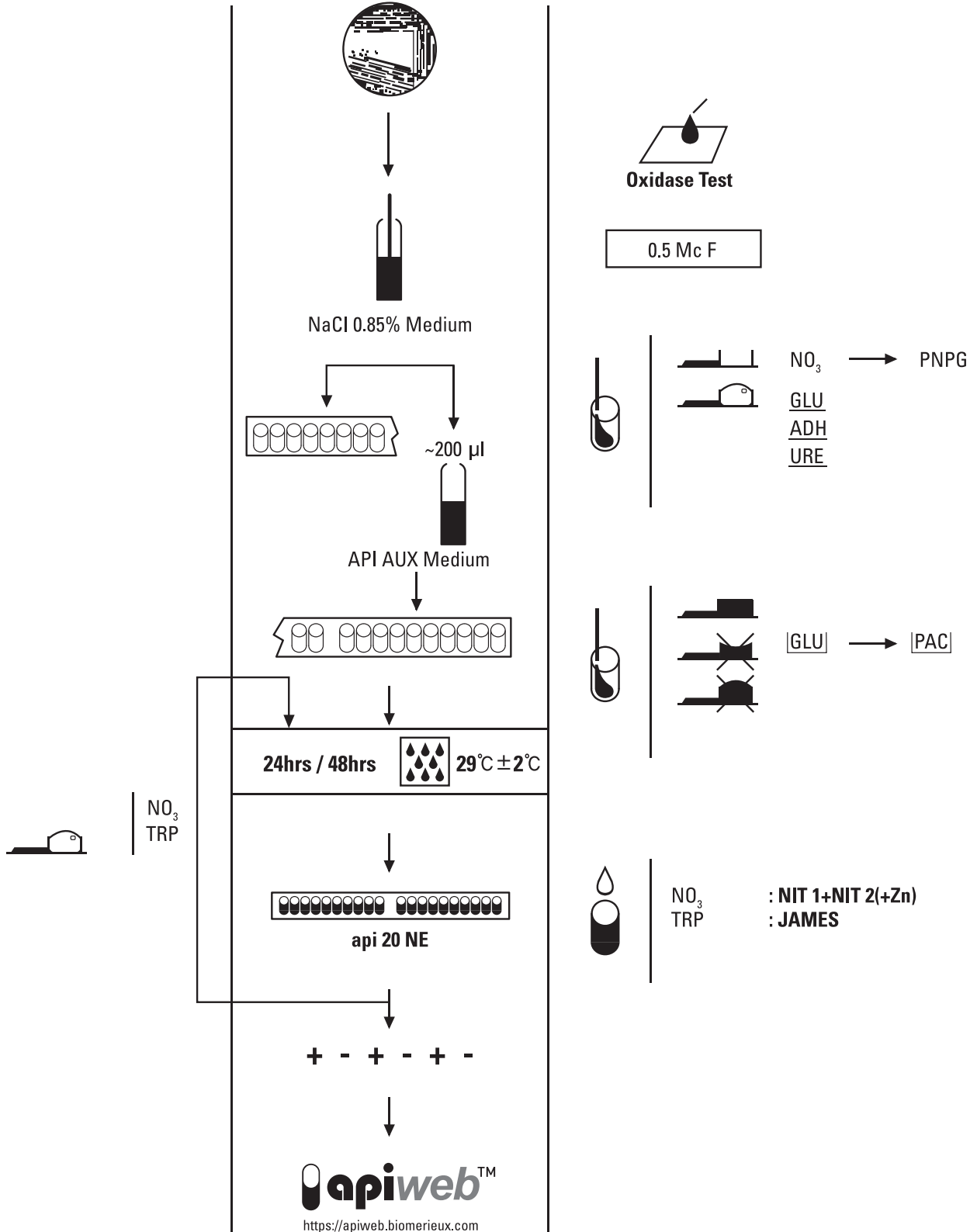
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
4. *Alcaligenes faecalis* ATCC 35655

## 판 독 표

| TESTS           | ACTIVE INGREDIENTS                             | QTY<br>(mg/cup.) | REACTIONS / ENZYMES  | RESULTS                           |                              |
|-----------------|--|------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
|                 |  |                  |  | NEGATIVE                          | POSITIVE                     |
| NO <sub>3</sub> | potassium nitrate                              | 0.136            | reduction of nitrates to nitrites  | NIT 1 + NIT 2 / 5 min             |                              |
|                 |  |                  | reduction of nitrates to nitrogen  | colorless                         | pink-red                     |
|                 |  |                  |  | pink                              | Zn / 5 min<br>colorless      |
| TRP             | L - tryptophane                                | 0.2              | indole production (TRyptophane)  | JAMES / immediate                 |                              |
|                 |  |                  |  | colorless<br>pale green / yellow  | pink                         |
| GLU             | D-glucose                                      | 1.92             | fermentation (GLUcose)   | blue to green                     | yellow                       |
| ADH             | L-arginine                                     | 1.92             | Arginine DiHydrolase   | yellow                            | orange / pink / red          |
| URE             | urea   | 0.76             | UREase   | yellow                            | orange / pink / red          |
| ESC             | esculin<br>ferric citrate                      | 0.56<br>0.072    | hydrolysis ( $\beta$ - glucosidase) (ESCulin)                                  | yellow                            | grey / brown / black         |
| GEL             | gelatine<br>(bovine origin)                    | 0.6              | hydrolysis (protease) (GELatin)  | no pigment<br>diffusion           | diffusion of<br>black pigmen |
| PNPG            | 4-nitrophenyl- $\beta$ D-<br>galactopyranoside | 0.22             | $\beta$ - galactosidase (Para-NitroPhenyl -<br>$\beta$ D- Galactopyranosidase) | colorless                         | yellow                       |
| [GLU]           | D-glucose                                      | 1.56             | assimilation (GLUcose)   | transparent                       | opaque                       |
| [ARA]           | L-arabinose                                    | 1.4              | assimilation (ARABinose)   | transparent                       | opaque                       |
| [MNE]           | D-mannose                                      | 1.4              | assimilation (ManNosE)   | transparent                       | opaque                       |
| [MAN]           | D-mannitol                                     | 1.36             | assimilation (MANnitol)  | transparent                       | opaque                       |
| [NAG]           | N-acetyl-glucosamine                           | 1.28             | assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)  | transparent                       | opaque                       |
| [MAL]           | D-maltose                                      | 1.4              | assimilation (MALtose)   | transparent                       | opaque                       |
| [GNT]           | potassium gluconate                            | 1.84             | assimilation (potassium GlucoNate)   | transparent                       | opaque                       |
| [CAP]           | capric acid                                    | 0.78             | assimilation (CAPric acid)   | transparent                       | opaque                       |
| [ADI]           | adipic acid                                    | 1.12             | assimilation (ADIpic acid)   | transparent                       | opaque                       |
| [MLT]           | malic acid                                     | 1.56             | assimilation (MaLaTe)  | transparent                       | opaque                       |
| [CIT]           | trisodium citrate                              | 2.28             | assimilation (trisodium CITrate)   | transparent                       | opaque                       |
| [PAC]           | phenylacetic acid                              | 0.8              | assimilation (PhenylACetic acid)   | transparent                       | opaque                       |
| OX              | (see oxidase test package insert)              | -                | cytochrome oxidase   | (see oxidase test package insert) |                              |

# API 20 NE | 장내세균 이외의 그람 음성간균의 동정

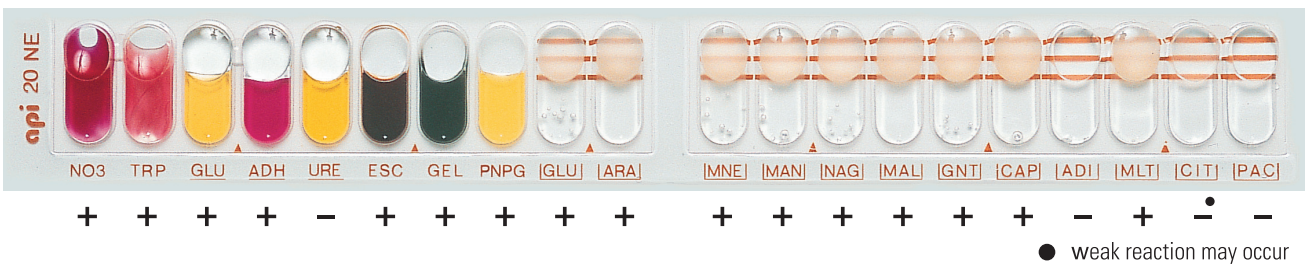
## 검사방법



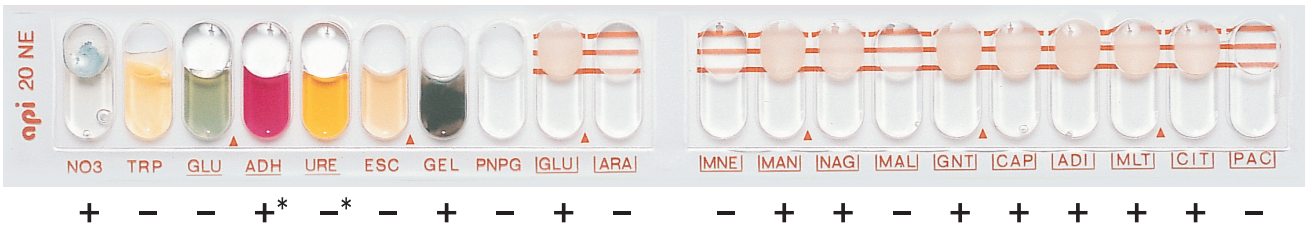
# api® 20 NE

## READING / LECTURE - INTERPRETATION

*Aeromonas hydrophila* ATCC 35654



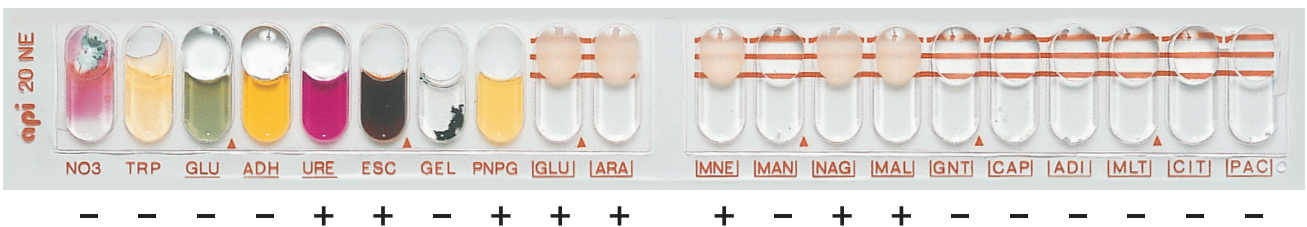
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*Alcaligenes faecalis* ATCC 35655



*Sphingobacterium multivorum* ATCC 35656



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

