

# API Listeria

## Listeria균의 동정

원리 .....	042
시약 .....	042
배지와 시약의 성분 .....	042
스트립과 배지의 보관 .....	042
시약의 보관 .....	042
시약의 이용 .....	042
사용상 주의사항 .....	042
실험방법 .....	043
사용한 재료의 처리 .....	043
QC .....	044
판독표 .....	045
검사방법 .....	046
READING / LECTURE - INTERPRETATION .....	047
REF. 10 300 : 10 strips + 10 media .....	048

# API Listeria | Listeria균의 동정

## 원리

- API Listeria 스트립은 당의 발효나 효소 활성도를 확인하기 위한 건조된 기질을 함유하고 있는 10개의 microtube로 구성되어 있다.
- 배양 시간 동안 생성된 반응 산물들에 의해 색이 변하거나 보조시약의 첨가로 색이 변한다.
- 배양 후 인터넷 사이트 *apiweb™* (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 접속하여 동정 결과를 판독한다.

## 시약

### Kit 구성(10 테스트)

- API Listeria 10 strips
- API Suspension Medium 10 ampules
- ZYM B 시약 1 ampule
- 배양용 박스 10개
- 결과지 10장
- Package insert 1부

### 보조 시약(별도구매)

- McFarland Standard (ref. 70 900)
- Identification software (*apiweb™*)
- PSipettes (ref. 70 250)

### 필요한 실험 기자재

- General microbiology laboratory equipment

## 배지와 시약의 성분

API Suspension Medium 2 ml	Demineralized water	
ZYM B reagent 3 ml	Fast Blue BB (active ingredient) 2-methoxyethanol	0.12 g 100 ml

## 스트립과 배지의 보관

사용하지 않은 스트립의 보관 조건은 2-8°C에서 보관하면 유효 기간까지 사용할 수 있다.

## 시약의 보관

포장에 명시된 유효 기간까지 2-8°C의 암소에서 보관 한다.

시약은 앰플을 개봉하여 dropper-bottle에 옮긴 후 한 달 동안 사용이 가능하다. ZYM B 시약은 빛에 매우 약하므로 알루미늄 호일로 싸서 냉장고 안에서 보관하고 장시간 동안 실온에 방치하여서는 안된다.

ZYM B 시약은 노란색이며 옅은 pink색으로 변하면 사용하지 않는다.

## 시약의 이용

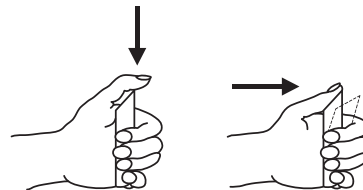
다음 시약들은 사용하기 전에 미리 실온(20-30°C)에 꺼내 둔다.

(1) ZYM B reagent

앰플을 열고 시약을 한 방울씩 떨어뜨려 사용한다.

## 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 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.
- 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 미생물 학자에 의해서 이루어져야 한다. 만약 필요하다면 다른 종류의 테스트 결과 특히 항생제 감수성 검사를 시행한다.

## 실험방법

### 균의 선택

- 균의 성상은 25℃에서 운동성이 있고 polymorphic한 그람양성 단간균이면서 catalase 양성, oxidase 음성인 특징을 가진다.
- Listeria의 여러 type이 섞여 있을 경우 혈액배지에 36±2℃에서 24시간 동안 subculture를 해서 분리한다.

\* **NOTE** : API Listeria Strip을 사용 하기 전 colony를 취하기 위해서 다음과 같은 배지를 사용해야 한다.

- 항생제가 첨가되거나 첨가되어 있지 않은 Columbia나 TSA 혈액배지
- Listeria 선택 배지 중 API Listeria 스트립에서 bacteria의 효소 반응을 억제하는 McBride medium을 제외한 다양한 배지사용 가능. 만약 McBride medium에서 배양한 경우에는 혈액배지에서 한 번 더 계대한 후 사용한다.

### 스트립의 준비

- Incubation box를 준비하고 약 3ml의 멸균 증류수를 tray에 부어서 수분을 유지하도록 한다.
- Tray의 끝에 균주의 정보를 기록한다.
- 스트립을 tray 위에 올려놓는다.
- Listeria를 식품이나 환경에서 분리하는 경우에는 OAA(ref. 43 641) medium을 사용할 수 있다.


### 접종액의 준비

- Suspension medium(2ml)의 앰플을 열고 잘 분리된 몇 개의 colony를 취한 후 골고루 부유 시켜 1 McFarland로 맞춘다.
- Hemolysis 결과를 결과지에 기록해 둔다.

### 스트립의 접종

- 1 McFarland로 맞춘 균액을 DIMI 튜브와 큐플에 접종한다(약 100μl).
- 위 균액을 ESC에서 TAG까지는 튜브 부분까지 분주한다(약 50μl).
- 인큐베이션 박스 뚜껑을 덮고 36±2℃에서 18-24시간 호기 상태로 배양한다.

\* **NOTE** : Tube에 균액이 많이 들어가거나 적게 들어가는 경우는 위 양성 혹은 위음성의 결과가 나올 수 있다.

\* **TIP**  큐플 튜브

### 스트립의 판독

- DIMI Test에는 ZYM B 시약을 한 방울 떨어 뜨린다.
- 3분 이내에 판독표에 따라 반응을 읽는다.
- 결과지에 기록한다.

### 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>)

## 사용한 재료의 처리

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

# API Listeria | Listeria균의 동정

## QC

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

	[DIM]	ESC	$\alpha$ MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
1	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
2	+	+	-	+	+	-	V	-	+*	-
3	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

1. *Listeria innocua*

ATCC 33090

2. *Listeria ivanovii*

ATCC BAA-139

3. *Listeria monocytogenes*

ATCC 19115

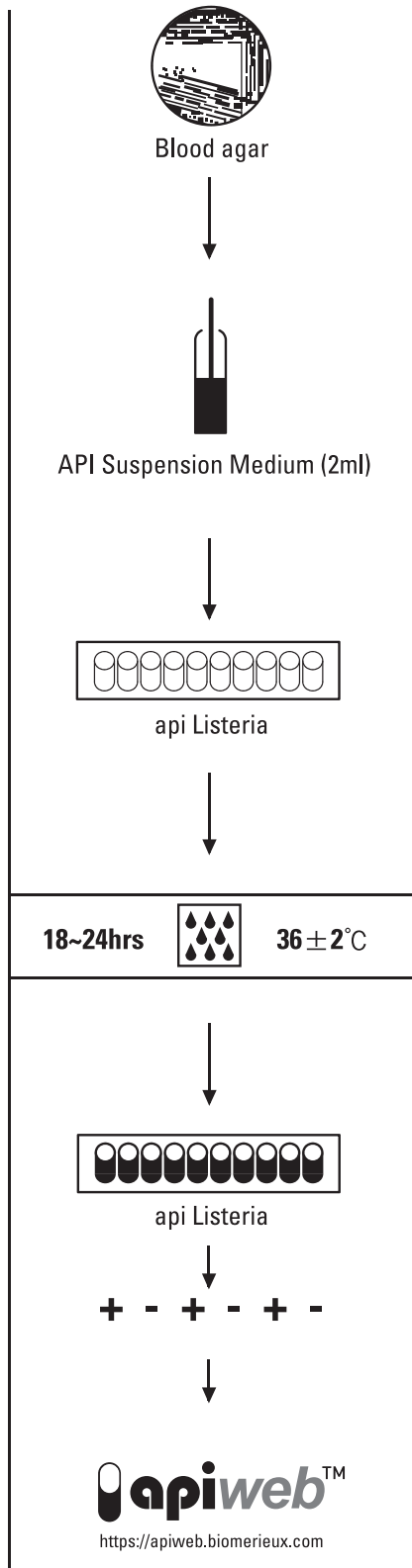
\* 때때로 음성반응일 수도 있다.

## 판 독 표

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
[DIM]	Enzymatic substrate	0.106	Differentiation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	<u>ZYM B / &lt; 3 min</u>	
				pale orange pink beige grey beige	orange
ESC	Esculin Ferric citrate	0.16 0.024	hydrolysis (ESCulin)	pale yellow	black
$\alpha$ MAN	4-nitrophenyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	0.045	$\alpha$ -MANnosidase	colorless	yellow
DARL	D-ArabitOL	0.4	acidification (D-ARabitOL)	red / orange-red	yellow / yellow-orange
XYL	D-Xylose	0.4	acidification (XYLose)		
RHA	D-Rhamnose	0.4	acidification (RHAMnose)		
MDG	Methyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	0.4	acidification (Methyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside)		
RIB	D-Ribose	0.4	acidification (RIBose)		
G1P	Glucose-1-Phosphate	0.4	acidification (Glucose-1-Phosphate)		
TAG	D-Tagatose	0.4	acidification (TAGatose)		

# API Listeria | Listeria균의 동정

## 검사방법



1 Mc F



**[DIM]**

ESC → TAG



**[DIM] : ZYM B**

# api<sup>®</sup> Listeria

## READING / LECTURE - INTERPRETATION

*Listeria monocytogenes* ATCC 19115 - 4B



*Listeria ivanovii* ATCC 700402



*Listeria innocua* ATCC 33090



*Listeria dysgalactiae* ATCC 43078



\*\* 위 예제들이 설명서의 판독표를 대체할 수는 없습니다.

# API Listeria | Listeria균의 동정



API Listeria V1.2	DIM	ESC	$\alpha$ MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG	$\beta$ HEM*
<i>Listeria grayi</i>	99	100	99	100	1	16	33	100	0	0	-
<i>Listeria innocua</i>	99	100	98	100	2	66	98	0	0	0	-
<i>Listeria ivanovii</i>	88	100	0	99	97	4	99	33	91	0	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	100	98	97	0	98	100	0	5	0	+(-)
<i>Listeria seeligeri</i>	97	100	5	99	99	0	99	0	0	0	+
<i>Listeria welshimeri</i>	90	100	96	100	98	76	99	0	0	97	-

24hrs (35~37° C)

API Listeria Ref. 10 300 : 10 strips + 10 media

\* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology p./str. 1241

- + + : 100%
- + : > 90%
- + (-) : 70~90%
- - : < 10%