

製品概要

API® 20 Aは嫌気性菌を同定するために定性的に標準化されたキットです。プレートにあるマイクロチューブでの生化学試験と専用のデータベースを用いて同定を行います。

菌液の接種・分注は手動、プレートの判定は目視で行い、菌名同定用ソフトウェア (アピウェブ) を用いて同定結果を得ます。

このシステムで同定可能な菌種リストは、アピウェブ内で公開されているテクニカルブローシャーで閲覧可能です。

原理

API® 20 A プレートは、乾燥基質を含む20個のマイクロチューブで構成されています。調製された菌液を分注し、乾燥基質を再溶解します。培養中に代謝反応があった場合、自発的に色が変化するか、あるいは添加試薬を加えることによって色が変化します。反応は、判定表に従って判定し、同定は菌名同定用ソフトウェア (アピウェブ) を使用して行います。

キットの構成

25 テスト (バイオメリユー品番 20300)

- API® 20 A プレート 25ストリップ
- API® 20 A 培地 25本
- 培養容器 (蓋・トレイ) 25セット
- 成績記入用紙 25枚
- 使用説明書は当社ウェブサイトからダウンロード可能です。 (<https://resourcecenter.biomerieux.com/>)

組成**プレートの組成**

API® 20 A プレートの組成は本使用説明書の判定表に記載の通り。

培地の組成

API® 20 A 培地 4 mL	Trypticase	5 g
	Yeast extract	5 g
	Sodium chloride	2.5 g
	L-Tryptophan	0.2 g
	L-Cystine	0.4 g
	Hemin (porcine origin)	0.005 g
	Vitamin K ₁	0.01 g
	Sodium sulfite	0.1 g
	DeminerIALIZED water	to make 1000 mL
	pH: 6.9-7.3	

表示量は、使用する原材料の力価に応じて調製されます。

本品を使用の際に必要な試薬および器具**試薬**

- ミネラルオイル (バイオメリユー品番 70100)
- マクファーランドスタンダード (バイオメリユー品番 70900) No.3
- 過酸化水素水 (3%)
- 添加試薬:
 - BCP試薬 (バイオメリユー品番 70510)
 - EHR試薬 (バイオメリユー品番 70520)
 - XYL試薬 (バイオメリユー品番 70530)

器具

- 滅菌綿棒 (バイオメリュー品番 70610)
- アピピベット (バイオメリュー品番 234-1S) または類似品
- 試験管立て
- アンブルプロテクター
- 嫌気ジャー
- 紫外線ランプ (365 nm)
- デンシマット (バイオメリュー品番 99234) (オプション)
- 一般的な微生物試験に必要な器具
- アピウェブ ライセンス (バイオメリュー品番 424275)

使用上の注意

- **研究・産業分野の試験目的のみにご使用ください。診断目的には使用できません。**
- **熟練者がご使用ください。** 本製品は熟練者による使用を目的としています。
- 本キットには動物由来製品が含まれます。使用動物の由来や衛生状態は保証されていますが、このことは感染性病原体による製品汚染が全く無いことを完全に保証するものではありません。従ってこれらの製品は感染性を有するものとして扱い、飲んだり吸い込んだりしないよう、一般的な安全予防策を守って取り扱うことをお勧めします。
- 検査材料、細菌培養、および接種菌液はすべて感染性があるものとして、適切に取り扱う必要があります。検査全体を通じて、細菌を扱う際には無菌操作の実施と一般的な注意を払う必要があります。"NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - December 1997".を参照して下さい。取り扱い注意事項の追加情報としては、"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)" または、各国で現在使用されている規定に準拠して下さい。
- 使用期限が過ぎた製品は使用しないで下さい。
- 使用前に全ての内容物に破損がないか確認して下さい。
- カップが変形している、乾燥剤の小袋が開いているなど、破損したプレートは使用しないで下さい。
- プレートは、一度のみ使用し、再利用しないで下さい。
- 試薬を室温に戻してから使用して下さい。
- テクニカルプロシャーに記載された性能データは、本書に記載された操作方法に従って試験をして得られたものです。方法の変更や改変は、同定結果に影響する可能性があります。
- 試験結果の解釈は、サンプルの由来、分離菌株のコロニー形態や検鏡像、必要に応じて実施された他の検査の結果を考慮して行ってください。

保管条件

プレートおよび培地はパッケージに記載の有効期限まで2-8℃で保管して下さい。

検体の採取および前処理

API® 20 Aに分離培養前のサンプルを直接接種しないでください。

試験に供する菌株は、一般的な細菌検査法に従って適切な培地で分離培養する必要があります。

使用方法

プレートの準備

1. 湿潤環境を保つためにトレイの穴に約5 mLの蒸留水や脱塩水、(またはガス(例えば、Cl₂、CO₂ など)を放出する可能性のある添加物や化学薬品を含まない水)を入れて下さい。
2. トレイの端に検体名を記入して下さい(蓋に検体番号を記載した場合、操作中に置き間違える可能性があります)。
3. 使用直前に包装を開封してプレートを取り出します。
4. プレートを培養容器に入れます。

菌液の調製

1. 次の手順に従ってAPI® 20 A 培地のアンプルを開封します。



- アンプルをアンプルプロテクターに差し込んで下さい。
- アンプルプロテクターに入ったアンプルを片手で垂直位置に持って下さい (白いプラスチックキャップが上になるように立てます)。
- キャップをできる限り下方向に押し込みます。
- キャップの溝面部分に親指を置き、前方に押し出してアンプルの先端部を折ります。
- アンプルをアンプルプロテクターから取り出し、次の使用のために近くに置きます。
- キャップを注意深く取り除きます。

2. 嫌気条件下で発育した血液寒天培地または互換性のある培地上のコロニーを、滅菌綿棒で全て掻きとります。培養時間が18時間-24時間と短く新鮮なコロニーを使用してください。また、純培養菌であることを確認してください。(純培養菌でない場合、単一分離しているコロニーを継代培養してから試験に使用してください。)

3. アンプルを垂直に立て、滅菌綿棒を懸濁液面から出さないように注意しながら、滅菌綿棒を回転させたり、滅菌綿棒をアンプル壁面に押し付けて、菌液を作成します。最終的にはマクファーランドスタンダードと比較またはデンシマットを用いてマクファーランド濁度3以上の均一な菌液を調製します。菌液は、直ちに使用してください。発育の遅い菌では、この濁度の菌液を調製するために2枚以上の血液寒天培地が必要になることがあります。

注記：嫌気状態を維持するために、菌の懸濁中に空気が培地に入らないようにしてください。

プレートへの菌液分注

1. アピピペットを用いて、API® 20 A 培地で調製した菌液を分注して下さい。チューブ底部に気泡が形成されるのを避けるため、プレートを僅かに前方に傾けて、アピピペットの先をカップの側面に付けて操作してください。:

- **IGEL**試験はチューブ部分とカップ部分の両方に菌液を分注します。
- **IND**試験はチューブ部分にAPI® 20 A 培地で調製した菌液を分注し、カップ部分にはインドールの揮発を防ぐためにミネラルオイルを重層します。

2. 培養容器に蓋をし、嫌気チャンバーや嫌気ジャー、嫌気パックの中で、 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24時間 (± 2 時間) 培養します。

3. 残りのAPI® 20 A 培地の菌液を寒天培地2枚に接種し、1枚は好気条件下、もう1枚は嫌気条件下で培養を行うことで、菌液の純培養の状態および発育状態を確認することができます。

判定および解釈

プレートの判定

注記：嫌気性菌の多くは24時間以内に明確で容易に判定できますが、菌株によっては発育が遅く、培養48時間後にのみ読み取りが可能になることがあります。

1. 培養後、判定表およびアピウェブの“色見本”を参照してプレートの読み取りを行います。

2. 添加試薬を必要としない自発的反応を全て成績記入用紙に記録します。

3. 添加試薬が必要な反応は以下に従って判定して下さい。

- 反応中に存在するBCPが還元反応によって脱色することがあります。この場合、糖が入っている全ての各マイクロチューブにBCP試薬を1滴ずつ添加してから酸化反応を判定して下さい。**黄色**または**黄緑色**を陽性反応として、成績記入用紙に記録します。
- **IND**試験: 重層したミネラルオイルにXYL試薬を1滴添加し、適切な棒を用いて混和して、2-3分間放置します。その後、EHR試薬を1滴添加します。この試薬は必ずキシレン/ミネラルオイル上に浮かべて下さい。(このようにすることで、マイクロチューブ中の色が希釈されません。)5分以内に判定して下さい。**赤色**を陽性反応として、成績記入用紙に記録します。
- **CAT**試験: カタラーゼ産生能は、プレートを空気に30分間さらしてから判定して下さい。陽性を示したマイクロチューブに過酸化水素水(3%)を2滴添加します。**気泡**が発生すれば**陽性**とし、成績記入用紙に記録します。

解釈

プロファイル番号の決定

成績記入用紙には、API® 20 A プレートに含まれる20種類の試験項目に加えて、カタラーゼ反応および3種類の形態学的特徴の項目 (SPOR : 芽胞の有無、GRAM : グラム陽性または陰性、COCC : 球菌か否か) が記載されています。成績記入用紙上で、各試験項目は3項目ずつのグループに分けられ、各項目に1、2、4の数値が付与されています。グループ毎に陽性反応を示した項目の数値を加算し、8桁のプロファイル番号を算定します。

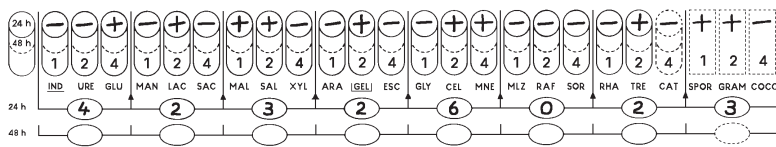
同定

同定は、アピウェブ 菌名同定用ソフトウェアを用いて行います。

- API® システムでは、分析対象の微生物とその生化学反応におけるデータの特徴に基づいた方法を用いて微生物を同定します。一連の様々な生化学基質に対する各菌種の典型的な反応を推定するために、既知の菌株から十分なデータが収集されました。典型的な生化学反応パターンが認められない場合は、可能性のある菌種のリストが表示されるか、その菌株はデータベースには含まれない菌種であるという結果となります。ソフトウェアコメントおよび/または印刷されるレポートには、最終的な同定結果を得るために必要な追加試験項目が記載されます。それでも同定結果が得るのに不十分な場合には、微生物学の参考文献や書籍を参照してください。
- 特定の菌種は、スラッシュライン (混合) 分類群に含まれる場合があります。これは、表示された複数の分類群で、バイオパターンが同じであるために起こります。スラッシュラインに含まれる分類群を判別するために、追加試験を実施する場合があります。

追加試験は、テクニカルプロシチャーに記載されています。

以下に、プロファイル番号の例を示します。

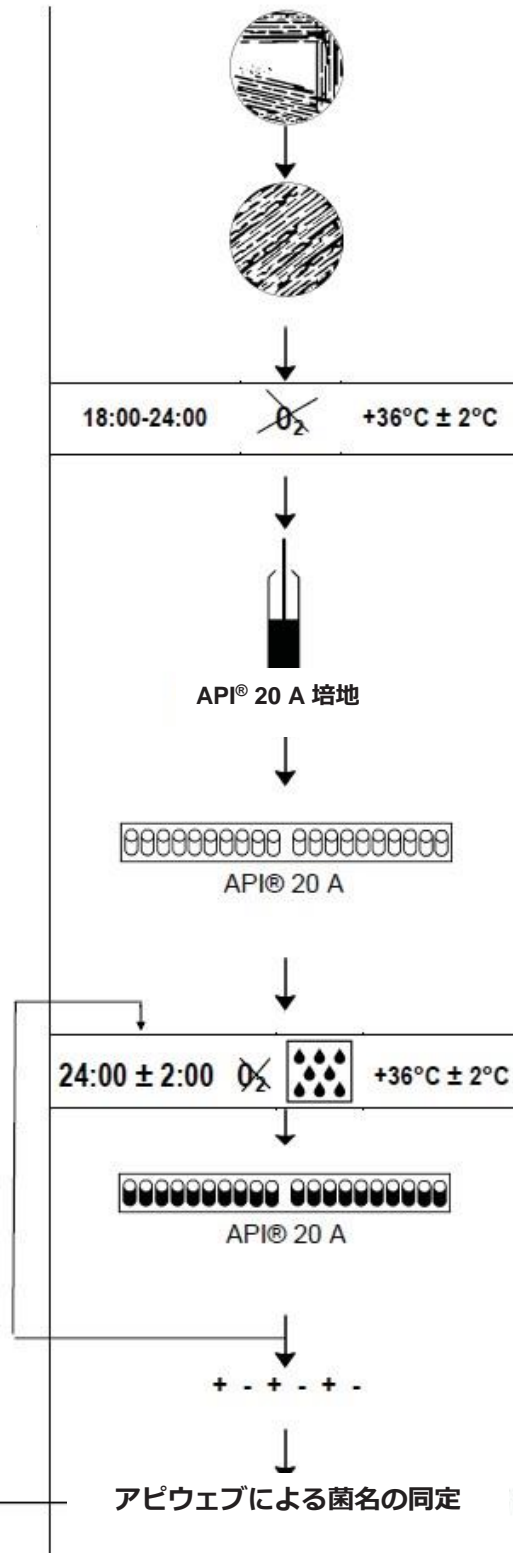


4 232 602 3 *Clostridium septicum*

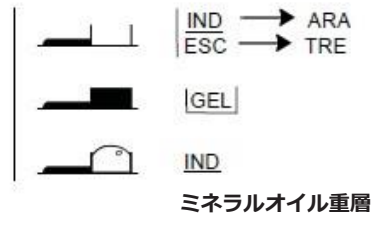
使用方法

- 芽胞の有無
- グラム染色
- 球菌 / 桿菌

試験項目
22-23-24



3 McF



+ - + - + -

アピウェブによる菌名の同定

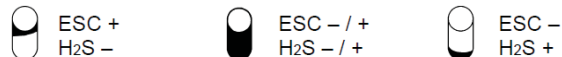
判定表

試験項目	有効成分	QTY (mg/ カップ)	反応/ 酵素	結果	
				陰性	陽性
IND	L-トリプトファン	0.98	インドール生成	XYL-混合2-3分後 + HER添加5分以内に判定 黄色 赤色	
URE	尿素	0.648	ウレアーゼ	黄色-オレンジ色	赤色
GLU	D-グルコース	1.96	酸性化 (グルコース)	BCP試薬添加後判定 紫色 黄色 / 黄色- 緑色	
MAN	D-マンニトール	1.96	酸性化 (マンニトール)		
LAC	D-ラクトース (牛由来)	1.96	酸性化 (ラクトース)		
SAC	D-サッカロース (スクロース)	1.86	酸性化 (サッカロース)		
MAL	D-マルトース	1.96	酸性化 (マルトース)		
SAL	サリシン	1.64	酸性化 (サリシン)		
XYL	D-キシロース	1.64	酸性化 (キシロース)		
ARA	L-アラビノース	1.64	酸性化 (アラビノース)		
GEL	ゼラチン (bovine origin)	0.6	加水分解 (プロテアーゼ) (ゼラチン)		
ESC	エスクリン クエン酸第二鉄	0.36	加水分解(β-グルコシダーゼ) (エスクリン)	黄色 ²⁾	茶色-黒色 ²⁾
		0.11		UV (365 nm) 蛍光の発光 発光なし	
GLY	グリセロール	1.82	酸性化 (グリセロール)	BCP試薬添加後判定 紫色 黄色 / 黄色- 緑色	
CEL	D-セルビオース	1.86	酸性化 (セルビオース)		
MNE	D-マンノース	1.96	酸性化 (マンノース)		
MLZ	D-メレチトース	1.96	酸性化 (メレチトース)		
RAF	D-ラフィノース	2.18	酸性化 (ラフィノース)		
SOR	D-ソルビトール	2.18	酸性化 (ソルビトール)		
RHA	L-ラムノース	1.96	酸性化 (ラムノース)		
TRE	D-トレハロース	1.96	酸性化 (トレハロース)		
CAT	-	-	カタラーゼ		
SPOR	-	-	芽胞の有無	無	有
GRAM	-	-	グラム染色	ピンク色	紫色
COCC	-	-	形態	桿菌	球菌

1) 丸型のジャーで培養した場合、チューブの底部のみに色素の拡散が認められます。

2) 茶色-黒色は、プレートが空気に曝されたときに発色する場合がありますので、判定時には十分考慮して下さい。

黒色は硫化水素H₂Sがクエン酸第二鉄と反応して硫化鉄 (FeS) が形成されたために生じたものと考えられます。この黒色はエスクリンの加水分解によるものではありません。硫化鉄はチューブの底部に沈殿物を作り、エスクリンの加水分解はチューブの上部に茶色-黒色を作るので、これら2つの反応は区別可能です。チューブ全体が黒色となる場合や疑わしい場合は、紫外線を照射して蛍光の発光で判定して下さい。



表示量は、使用する原材料の力価に応じて調製されます。

一部のカップには、動物由来の製品、特にペプトンが含まれています。

品質管理

本培地、プレートおよび試薬については、製造の様々な工程において体系的に品質管理が行われています。

総合的品質管理試験を実施する必要がある場合、以下の菌株を用いて各項目の陽性および陰性反応を確認して下さい。

1. *Clostridium perfringens* ATCC® 13124™ または以下のいずれかの菌株を使用して下さい。:
2. *Bacteroides ovatus* ATCC® 8483™
3. *Clostridium sordellii* ATCC® 9714™

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA
1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-

	[GEL]	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
1	+	-	+	-	+	-	-	V*	-	+	-
2	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*本結果は使用する培地により異なります。

これらは、コロンビアヒツジ血液寒天培地で24時間培養したコロニーを用いて得られたプロファイルです。

各国の定める規則に従って、本キット使用者の責任のもとで品質管理を実施して下さい。

品質管理株は、同定性能ではなく、反応性能を考慮して選択されています。

一般に、品質管理株は、単一の分類群、低い識別、または混合分類群として同定されます。

すべての反応が適合の場合においても、ATCC®株の同定結果が誤同定となる可能性があります。


注記: 菌株名は随時更新される可能性があるため、最新の更新情報については公式の分類法を参照してください。

テクニカルブローチャー： 菌名同定用ソフトウェアに関する情報

次の項目は、テクニカルブローチャーに詳しく記載されています。

- 本手法の使用制限
- 同定表 (%)
- 性能

テクニカルブローチャーを参照するには、次の手順に従ってください:

- アピウェブにログイン後
 - 次のマークをクリックします 
 - “テクニカルブローチャー”をクリックします











廃棄処理

使用済みもしくは未使用の試薬の廃棄に関しては他の汚染した廃棄材料と同様、感染性もしくは感染の危険のある製品の取扱方法に従って行ってください。起こりうる危険を適切に考慮の上、各検査室の責任の元、廃棄産物や流出物はそれぞれの危害毒性や度合いを考慮し、地域の適切な規制に従って廃棄してください。

参考文献

1. DRUGEON, H., BILLAUDEL S., COURTIEU A. L.
Utilisation d'une microgalerie pour l'identification des bactéries anaérobies. (1977) Ann. Biol. Clin., 35, 409-414.
2. ESSERS L., HARALAMBIE E.
Experiences with the API 20 A System in routine species identification of anaerobes. (1977) Zbl. Bakt. Hyg. Parasitenk-1, Abt-A, 238, 394-401.
3. VERSALOVIC J., CAROLL K.C., FUNKE G., JORGENSEN J.H., LANDRY M.L., WARNOCK D.W. Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. (2011) American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. NORD C.E., DAHLBACK A., WADSTROM T.
Evaluation of a Test Kit for Identification of Anaerobic Bacteria. (1975) Med. Microbiol. Immunol., 161, 239-242.
5. STARR S.E., THOMPSON F.S., DOWELL V.R., BALOWS A.
Micromethod System for Identification of Anaerobic Bacteria. (1973) Appl. Microbiol., 25, 713-717.

シンボルマーク

記号	内容
	品番
	製造元
	保管温度
	使用期限
	ロット番号
	再利用禁止
	取扱説明書を参照
	<n> 回分の試験を含む
	製造日
	湿潤環境

製品に関する保証

当社は当該製品に関する使用方法、保管条件、使用期限及び注意事項等のすべての手順が、使用説明書に記載されているとおりに遵守されている限り、用途に明示した性能を保証します。

上記した内容を逸脱し使用された場合は、当社は当該製品の商品性及び、特性の目的または使用の適合性に関して保証いたしません。またこのような場合、試薬、ソフトウェア、機器及び消耗品に関する一切の責任も負いません。

改訂履歴**改訂カテゴリ**

N/A	変更なし(初版)
Correction	誤植の修正
Technical Changes	製品に関連した情報の追加、変更およびあるいは削除
Administrative	技術関連ではない変更

注記: 軽微な誤記、言い回し、フォーマットの変更は改訂履歴には含まれません。

変更日	文書番号	カテゴリ	内容
2019/09	07882 I	Administrative	bioMérieuxテンプレートとスタイルガイドに従い、RECAST規制に準拠するための改善

BIOMERIEUX, the BIOMERIEUX logo, ATB, API and APIWEB are used, pending, and/or registered trademarks belonging to bioMérieux, or one of its subsidiaries, or one of its companies.

CLSI is a trademark belonging to Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

Any other name or trademark is the property of its respective owner.

BIOMÉRIEUX**バイオメリュー・ジャパン株式会社**

東京都港区赤坂二丁目17番7号

赤坂溜池タワー2階

Tel: 03-6834-2666 / Fax: 03-6834-2667

<https://www.biomerieux-industry.com/ja>

bioMérieux SA

376 Chemin de l'Orme

69280 Marcy-l'Etoile - France

RCS LYON 673 620 399

Tel. 33 (0)4 78 87 20 00

Fax 33 (0)4 78 87 20 90

www.biomerieux.com