CM0655 Legionella CYE Agar Base

관련제품

제품번호	제품명	구성
CM0989B	Modified Tryptone Soya Broth (mTSB)	500 gram for 15.2L medium
SR0181E	Novobiocin Supplement	10 vials for 5L medium

사용목적(Use)

임상 및 환경검체에서 Legionellaceae 를 분리하는데 사용.

조성(Typical Formulation)*

CM0655 : Legionella BCYE Growth Supplement SR0110 과 함께 사용했을 때 Legionellaceae 의 분리에 사용할 수 있는 Charcoal Yeast Extract Agar(Edelstein BYCE Agar)이다.

구성 성분	gm/litre
Activated charcoal	2.0
Yeast extract	10.0
Agar	13.0

SR0110 : Legionella BCYE Growth Supplement

바이알 내용물	SR0110A (배지 100ml 당 1 vial 사용)	SR0110C (배지 500ml 당 1 vial 사용)	리터 당 공급
Buffer/Pottassium hydroxide	1.0g	5.0g	10g
Ferric pyrophosphate	0.025g	0.125g	0.25g
L-cysteine HCl	0.04g	0.2g	0.4g
a-Ketoglutarate	0.1g	0.5g	1.0g
-			

SR0175 : Legionella BCYE Growth Supplement without L-cysteine

바이알 내용물	SR0175A (배지 100ml 당 1 vial 사용)	리터 당 공급
Buffer/Pottassium hydroxide	1.0g	10g
Ferric pyrophosphate	0.025g	0.25g
L-cysteine HCl	Nil	Nil
a-Ketoglutarate	0.1g	1.0g
-		

SR0111 : Legionella BMPA α Selective Supplement

바이알 내용물	SR0111E (배지 100ml 당 1 vial 사용)	SR0111B (배지 500ml 당 1 vial 사용)	리터 당 공급
Cefamandole	0.4mg	2.0mg	4.0mg
Polymyxcin B	8,000IU	40,000IU	80,000IU
Anisomycin	8mg	40mg	80mg
-			

SR0118 : Legionella MWY Selective Supplement

바이알 내용물	SR0118E (배지 100ml 당 1 vial 사용)	SR0118B (배지 500ml 당 1 vial 사용)	리터 당 공급
Glycine	0.3g	1.5g	3.0g
Polymyxin	5,000IU	25,000IU	50,000IU
Vancomycin	100µg	500µg	1.0mg
Bromothymol blue	1.0mg	5.0mg	10mg
Bromocresol purple	1.0mg	5.0mg	10mg
-			

조제 (Directions)

BCYE Agar 조제

2.5g 의 CM0655 를 90ml 의 정제수에 현탁하고 천천히 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15 분간 고압증기멸균한다. 50°C 로 식힌 후 재구성한 SR0110A 1 바이알을 첨가한다. 잘 혼합한 후 멸균된 페트리접시에 붓는다. 배지의 최종 pH 는 6.9 +/- 0.2 이다.

BCYE without L-cysteine Agar 조제

2.5g 의 CM0655 를 90ml 의 정제수에 현탁하고 천천히 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15 분간 고압증기멸균한다. 50°C 로 식힌 후 재구성한 1 바이알의 SR0175A 를 첨가한다. 잘 혼합한 후 멸균된 페트리접시에 붓는다. 배지의 최종 pH 는 6.9 +/- 0.2 이다.

BMPAα Legionella Selective Media 조제

2.5g 의 CM0655 를 90ml 의 정제수에 현탁하고 천천히 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15 분간 고압증기멸균한다. 50°C 로 식힌 후 각각 재구성한 1 바이알의 SR0110A 과 1 바이알의 SR0111E 을 첨가한다. 잘 혼합한 후 멸균된 페트리접시에 붓는다. 배지의 최종 pH 는 6.9 +/- 0.2 이다.

MWY Legionella Selective Media 조제

2.5g 의 CM0655 를 90ml 의 정제수에 현탁하고 천천히 끓여서 완전히 녹인다. 121°C, 15 분간 고압증기멸균한다. 50°C 로 식힌 후 각각 재구성한 1 바이알의 SR0110A 과 1 바이알의 SR0118E 을 첨가한다. 잘 혼합한 후

멸균된 페트리접시에 붓는다. 배지의 최종 pH 는 6.9 +/- 0.2 이다.

설명(Description)

미국 재향군인회 질병(Legionnaires' disease)의 원인 생물의 발견은 Fallon 에 의해 리뷰되었다 [1]. 그 이후 임상 검체에서 해당 미생물의 배양이 이루어졌고 환경 검체로부터 Legionella 종의 계수가 이루어져 진전이 있었다. Feeley 등 [2]은 F-G Agar[3]의 변형 배지를 서술하였는데 여기에는 단백질원으로서 산가수분해 카제인을 효모 추출물로 대체하였고 전분을 최종 농도 0.2%(w/v)의 활성 차콜(Norit A)로 대체하였다. 그들이 CYE Agar[2]라고 명명한 이 배지는 ACES Buffer 와 a-ketoglutarate 가 추가로 첨가되었으며 문헌에는 BCYE-a 배지로 설명되어 있다 [4]. BCYE-a 배지는 환경 검체 및 임상 검체로부터 보다 짧은 배양 시간으로 Legionellaceae 의 최적의 회복을 보여주었다 [5].

Oxoid BCYE 배지는 Edelstein[4]의 조성에 기반하며 Legionella CYE Agar Base (CM0655) 및 Legionella BCYE Growth Supplement (SR0110)을 이용하여 제조된다. 멸균상태의 동결 건조된 첨가제는 ACES Buffer/potassium hydroxide, a-ketoglutarate, ferric pyrophosphate, 그리고 L-cysteine HCl 을 포함한다. CYE Agar Base 에 이 첨가제를 넣으면 배지의 pH 는 6.9±2 로 안정화되며 필수 성장 인자들을 제공하게 된다.

이 배지는 다음의 첨가제가 추가될 수 있다:

Legionella BMPA Selective Supplement(SR0111)을 넣어 Legionella BMPA Selective Agar 를 만들 수 있다.

Legionella GVPC Selective Supplement(SR0152)을 넣어 Legionella GVPC Selective Agar 를 만들 수 있다.

Legionella GVPN Selective Supplement(SR0215)을 넣어 Legionella GVPN Selective Agar 를 만들 수 있다.

Legionella MWY Selective Supplement(SR0118)을 넣어 Legionella MWY Selective Agar 를 만들 수 있다.

또한, L-cysteine 이 없는 배지를 CM0655 에 BYCE Growth Supplement (SR0175)를 첨가하여 만들 수 있다.

Legionellaceae 는 L-cysteine 에 대한 절대적 영양 요구성을 가진다. *Legionella* spp.로 의심되는 집락을 L-cysteine 이 든 BCYE 배지 (CM0655 + SR0110)와 L-cysteine 이 없는 BCYE 배지 (CM0655+SR0175) 모두에 계대배양하여 확인할 수 있다. 모든 평판을 35°C에서 배양한다. L-cysteine 이 없는 BCYE 배지에서는 자라지 않고, L-cysteine 이 든 BCYE 배지에서 자란 집락은 추정적 *Legionella* spp.로서 간주될 수 있다.

배지	Legionella pneumophila ATCC® 33152 *	Escherichia coli ATCC® 25922 *
CM0655 + SR0175	-	+
CM0655 + SR0110	+	+
* Culti-Loop®로 판매되고 있음		

사용방법(Technique)

Legionella species 특징 (Renner & Tseng[10] 자료 인용)

특징	L. pneumophila	L. bozemanii	L. dumoffii	L. micdadei	L. gormanii	L. longbeachae	L. jordanis
Pirmay isolation on:							
BCYE Agar	+	+	+	+	+	+	+
Blood Agar	-	-	-	-	-	-	-
Colony color on dye containing medium	White green	Blue grey	green	green	green	White green	White green
Gram reaction	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Acidfast tissue	-	-	-	-	-	-	-
Flagella	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	+	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Beta-lactamase	+	+	+	-	+	+	+

BMPAα Legionella Selective Media 는 Edelstein[4]이 오염된 임상 및 환경 검체에서 *Legionella pneumophila* 의 분리에 권고한 배지이다.

MWY 배지는 Edelstein 이 Wadowsky and Yee Medium[7]을 변형한 배지 [8]로서 식수에서 *Legionella pneumophila* 를 분리하는데 최선의 배지로 고려된다. 환경 검체는 acid buffer(pH 2.2)[11]로 전처리하거나 열처리 [12]한 후 plate 에 접종한다. 이 배지는 임상검체 시험에서도 성공적으로 사용되는 것으로 보고되었다 [5].

GVPC 배지는 Dennis 등의 조성에 기반하며 다음의 사용법을 따른다:

임상검체

레지오넬라병이 임상적으로 의심되는 환자에서 *Legionella* spp.를 분리하기 위해서는 lung tissue 나 bronchial aspirate 에 대한 검사가 성공적이다.

1. 멸균 정제수에 환자의 검체를 균질화 한다.
2. 형광항체법(FA)를 이용하여 Legionella 를, 기타 세균은 그람염색을 이용하여 현미경적으로 검사한다.
3. 기타 미생물은 없으면서 FA-양성인 것을 BCYE 배지 평판상에 접종한다. 그람 염색으로 기타 미생물이 검출되는 FA-양성 및 FA-음성 검체는 선택배지인 BMPAα 에 접종한다.
4. 35°C 상대습도 90%에서 배양한다.
5. 성장은 2-3 일만에 일반적으로 나타나지만 14 일동안 매일 관찰을 지속하고 이후에 평판을 폐기한다.

환경검체

1. 농축된 검체 10ml 을 취해서 2,500rpm 에서 20 분간 원심분리한다.(밀봉된 버킷 사용)
2. 상층액을 제거하고 약 1ml 의 액체를 남긴다. 침전물과 남은 액체를 혼합하여 접종물로 사용한다.

3. 0.1ml 을 취해서 멸균 스프레드로 BCYE with selective agents 배지 및 BCYE without selective agents 배지에 접종한다.
4. 9ml 의 HCl-KCl 버퍼(pH2.2)를 첨가하고 잘 혼합한 후 5 분간 방치한다. (HCl-KCl 버퍼는 3.9ml 의 0.2M HCl 과 25ml 의 0.2M KCl 을 혼합하고 pH2.2 가 되도록 1M KOH 로 조절하여 조제한다).

산처리외의 다른 방법으로는 10ml 의 농축 검체를 50°C 수조에서 30 분간 열처리해준다.

주의! 산처리된 검체와 열처리된 검체는 서로 혼합하지 말 것

5. 0.1ml 을 취해서 멸균 스프레드로 BCYE 배지에 접종한다.
6. 35°C 에서 평판을 배양하고 최대 7 일까지 매일 관찰한다. *Legionella* 로 의심되는 집락들을 취해서 5%양혈액이 든 Tryptose Soya Agar 와 BCYE agar 에 계대배양한다. BCYE agar 에서는 성장하지만 TSA blood agar 에는 성장하지 않으면서 특징적인 성상의 집락을 보이는 것은 *Legionella* 로 추정된다. 생화학적 및 혈청학적 시험을 실시하여 확정한다 [12]. 제공되는 배지는 *Legionella* 종에 대해서 완전히 선택적이지는 않기 때문에 다음의 기준을 적용하여 평판을 검사하길 권장한다 [8]:
   a. 해부현미경으로 관찰했을 때 집락은 반드시 특징적인 색상, 크기, 모양을 가지고 있어야 한다.
   b. 분리된 균은 blood agar 나 BCYE agar without L-cysteine 에서 성장하지 않아야 한다.
   c. 특징적이 그람 성상을 보여주어야 한다.

   Legionella spp.는 다양한 배지상의 성장 성상 또는 생화학적 시험을 통해서 단독적으로 동정될 수 없기 때문에 DNA 상동성, 세포의 지방산, 그리고 혈청학검사를 이용한 추가 시험이 반드시 이루어져야 한다.

CYE/BCYE 배지에서 35°C, 2-3 일간 배양한 후 집락 성상

Legionella pneumophila : diameter 1-2 mm (increase in size on further incubation). White, glistening, circular, smooth, raised with an entire edge.

Legionella gormanii: diameter 1-2 mm. Buff-white or cream, slight raised, mucoid.

Other legionellae: (*Legionella micdadei, Legionella bozemanii, Legionella dumoffii, Legionella longbeachae* and *Legionella jordanis*) - indistinguishable from *Legionella pneumophila*.

최초 분리 후 그람 성상

Gram-negative, short, pleomorphic rods 1 mm long.

Legionellae 는 safranin 및 basic fuchsin 에 저항성이기 때문에 Carbol-fuchsin 을 legionellae 의 Gram films 에서 대조시약으로 사용해야 한다.

저장 조건 및 유효기간(Storage conditions and Shelf life)

분말배지 : 10~30°C 에서 보관. 라벨에 표시된 유효기한 전까지 사용

조제배지 : 2~8°C 에 차광 보관 한다.

성상 (Appearance)

분말배지 : 검정색의 유동성 분말

조제배지 : 검정색의 젤

품질관리(Quality Control)

비선택배지

양성대조군	예상 결과
Legionella pneumophilia ATCC® 33152*	좋은 성장; 회색/흰색 집락
Legionella pneumophilia NCTC 12821	좋은 성장; 회색/흰색 집락
음성대조군	**예상 결과**
무 접종 배지	변화 없음
* Culti-Loop®로 판매되고 있음	

선택배지

양성대조군	예상 결과
Legionella pneumophilia ATCC® 33152*	좋은 성장; 회색/흰색-푸른색이 감도는 집락
Legionella pneumophilia NCTC 12821	좋은 성장; 회색/흰색-푸른색이 감도는 집락
음성대조군	**예상 결과**
Staphylococcus epidermidis ATCC® 12228*	억제됨
* Culti-Loop®로 판매되고 있음	

주의사항(Precautions)

1. Legionella spp.는 흡입시 고도의 병원성 미생물이다. 에어로졸 생성을 피하고 균이 포함된 액체 또는 현탁액은 보호 캐비닛에서 다루어야 한다. 오염된 작업 표면은 5% hypochlorite 로 소독한다. 폐기전에 모든 재료는 멸균해야 한다.
2. 35°C 의 65%습도에서 최대 10 일간 배양한다.
3. BCYE 에서 배양은 CO_2 가 필요없으나 기타 배지 및 물 검체는 2.5% 의 CO_2 가 필요하다 [7,13].
4. Legionella 배지는 물론 혈액배지에서도 성장하는 미생물은 *legionellae* 가 아니다. 일부 호열성 포자 생성 미생물들이 35°C 에서 배양 후 *Legionella* 집락을 흉내낸다. 호열성 미생물들은 더 높은 온도에서도 성장하고 *Legionella* spp.는 45°C 이상에서 성장할 수 없기 때문에 이 미생물들은 35°C 와 55°C 에서 나란히 배양하면 구별할 수 있다.

참고문헌(Reference)

1. Fallon J. Oxoid Limited. Culture September 1979, P. 3-4.
2. Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed J.W., Mackel D.C. and Baine W.B. (1979) J. Clin. Micro. 10. 437-441.
3. Feeley J.C. Gorman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C. and Smith H.W. (1978) J. Clin. Micro. 8. 320-325.
4. Edelstein P.H. (1981) J. Clin. Micro. 14. 298-303.
5. PHLS Communicable Diseases Report (1983) CDR 83/49.
6. Edelstein P.H. and Edelstein M.A.C. (1991) J. Clin. Microbiol. 29. 190-191.
7. Wadowsky R.M. and Yee R.B. (1981) Clin. Microbiol. Newsletter 4. 768-772.
8. Edelstein P.H. (1982) J. Clin. Micro. 16. 697-699.
9. Vickers R.M., Brown A. and Garrity G.M. (1981) J. Clin. Micro. 13. 380-283.
10. Renner E.D. and Tseng C.H. (1982) Clin. Microbiol. Newsletter 4. 139, 142.
11. Bopp C.A., Sumner J.W., Morris G.K. and Wells J.G. (1981) J. Clin. Micro. 13. 714-719.
12. Vesey G., Dennis P.J., Lee J.V. and West A.A. (1988) J. Appl. Bact. 65. 339-345.

한글 설명서 제개정 1 (2019.06.20.)

수입/기술 지원

㈜메스디아

전화 02-313-4541 /팩스 02-313-4539

웹 www.mesdia.com / 일반 info@mesdia.com /

학술 techsupport@mesdia.com