

제7.4.13 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)

필요한 시액 및 배지 (자세한 사항은 제7.4.4 배지 및 시액 참조)

희석액

멸균인산완충희석액 (시액 1) : R112520
 멸균생리식염수 (시액 2) : BR0053G
 Ringer Solution Tablets, 100tabs (BR0052G)
 Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A (BR0014G)

배지

Alkaline 펩톤수(배지 16): CM1028B
 TCBS 한천배지(배지 17): CM0333B
 보통한천배지(배지 8): CM0017B
 보통배지(배지 7): CM0015B
 NaCl: Sodium chloride bacteriological, 500g, LP0005B

TSI 사면배지(배지 32): Triple Sugar Iron (TSI) Agar, 500g (CM0277B)
 LIM 반유동배지(Lysine Indole Motility Medium)(배지 18): [생배지]MIL Medium, 20x5ml (R061350)

생화학 동정 키트

RapID NF Plus Panel: 20 panels(R8311005)
 + RapID Inoculation Fluid (R8325102) (1 ml x 20tubes)
 + RapID Nitrate A Reagent (R8309003)(15 ml x 1Bottle)
 + RapID Spot Indole Reagent (R8309002)(15 ml x 1Bottle)

생화학 단일 시험

Oxidase 시험: Oxidase Strips, 50tests (MB0266A) 또는 BactiDrop Oxidase 0.75mlx50ampules (R21540)

Indole 시험

Microbact Spot Indole (DMAC), 10ml (MB1448A)
 또는 Indole Reagent, Kovac's, 25ml/bottle (R21227)
 또는 BactiDrop Indole, Kovac's, 0.75mlx50ampules (R21522)

VP 시험

MRVP Medium, 500g (CM0043B)
 Voges-Proskauer A reagent, 12ml (R21200) + Voges-Proskauer B reagent, 25ml (R21281)
 또는 BactiDrop Voges-Proskauer A, 0.75mlx50ampules (R21560)
 + BactiDrop Voges-Proskauer B, 0.75mlx50ampules (R21562)

Mannitol 이용성시험

Purple Broth Base(배지20)(R454352, 500g) + 1% Mannitol

Arginine 및 Ornithine 분해시험

Moeller Basal Broth(배지 21) + 1%Arginine 또는 1% Ornithine

ONPG 시험

ONPG Broth: 1mlx20(R062032), 2mlx500(EB0169A)
 또는 ONPG Discs, 50T (DD0013T)

분자진단

제품명	제품번호	용량	노트
TaqMan® Vibrio Multiplex Assay Beads	4485068	96 reactions	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>

4.13.1 정성시험

가. 증균배양

- ① 검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 Alkaline 펩톤수(배지 16)를 가한다.
- ② 35~37°C에서 18~24시간 증균배양한다.

나. 분리배양

- ③ 증균배양액을 TCBS 한천배지(배지 17)에 접종하여 분리배양한다.
- ④ 35~37°C에서 18~24시간 배양하고 의심집락을 관찰한다.
직경 2~4 mm인 청록색의 서당(sucrose) 비분해 집락에 대하여 확인시험을 실시한다.

다. 확인시험

- ⑤ 의심집락을 다음 배지에 접종하고 배양한 후, 결과를 관찰한다.

사용	배지	배양조건	양성 의심 결과
필수	TSI 사면배지 (배지 32)	35~37°C, 18~24시간	사면부가 적색(alkaline), 고층부는 황색(acid), 가스가 생성되지 않음 (균열없음)
	LIM 반유동배지 (배지 18)		Lysine Decarboxylase 양성(바닥이 보라색), Indole 생성(indole시약을 가하면 위쪽이 붉은 색을 띠), 운동성 양성(찌른 부위 주변으로 퍼져서 성장한다)
	2% NaCl을 첨가한 보통 한천배지 (배지 8)		-

- ⑥ 의심집락에 대해 다음 시험을 실시한다.

내염성 시험:

0% 및 10% NaCl을 가한 Alkaline 펩톤수: 발육 음성

3% 및 8% NaCl을 가한 Alkaline 펩톤수: 발육 양성

Oxidase 시험: 양성

VP 시험: 음성

Mannitol 이용성시험: 산생성(배지가 노란색을 띠)

Arginine 및 Ornithine 분해시험: Arginine 분해 음성, Ornithine 분해 양성

ONPG시험: 음성

3% NaCl을 가한 보통배지(Nutrient Broth) 성장 시험: 42°C에서 발육 양성

생화학 동정 키트 : RapID NF PLUS System

4.13.2 정량시험

가. 균수측정

- ① 검체 25 g 또는 25 mL를 취한 후, 225 mL의 희석액을 가하여 2분간 고속으로 균질화하여 시험용액을 준비한다. 시험용액을 10배 단계 희석액을 만든다.
- ② 각 단계별 희석액을 TCBS 한천배지(배지 17) 3장에 0.3 mL, 0.4 mL, 0.3 mL씩 총 증액이 1 mL이 되게 도말한다.
사용된 배지는 완전히 건조시켜 사용하고 접종액이 배지에 완전히 흡수되도록 도말한 후 10분간 실내에서 방치시킨다.
- ③ 35~37°C 에서 18~24시간 배양한 다음 청록색의 서당 비분해 집락을 계수한다.

나. 확인시험

- ④ 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 2% NaCl을 첨가한 보통한천배지(배지 8)에 접종한다.
- ⑤ 35~37°C에서 18~24시간 배양한다.
- ⑥ 형성된 집락에 대해서 제7.4.13.1 정성시험의 다. 확인시험을 실시한다.

다. 균수계산

- ⑦ 확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 계산한다.