



API[®] 50 CH 簡易使用ガイド

Rev_1_202207

詳細は使用説明書をご確認ください。

PIONEERING DIAGNOSTICS

API® 50 CH (品番: 50300)

を用いた微生物同定



■はじめに

API® 50 CHは、コントロールを含む 50 種の炭水化物代謝を試験することで、以下の3つの微生物グループを同定することができます。

- ① *Bacillus*属および関連菌種
- ② *Enterobacteriaceae*科、*Vibrionaceae*科
- ③ *Lactobacillus*属および関連菌種

■目的の微生物グループにあわせて用意するもの

API® 50 CHは、同定する微生物グループによって使用する培地や併用するキットが異なります。API® 50 CHをお使いいただく前に、試験する菌株が「① *Bacillus*属および関連菌種」、 「② *Enterobacteriaceae*科、*Vibrionaceae*科」、 「③ *Lactobacillus*属および関連菌種」のどれに含まれるかをご確認ください。

その結果に合わせて、菌液調製用培地や併用キットをご準備ください（下表）。

試験する菌種	① <i>Bacillus</i> 属 および関連菌種	② <i>Enterobacteriaceae</i> 科 <i>Vibrionaceae</i> 科	③ <i>Lactobacillus</i> 属 および関連菌種
菌液調製用 培地	API® 50 CHB/E 培地 (品番: 50430)		API® 50 CHL 培地 (品番: 50410)
併用キット	任意 API® 20 E (品番: 20100)	必須 API® 20 E (品番: 20100)	—



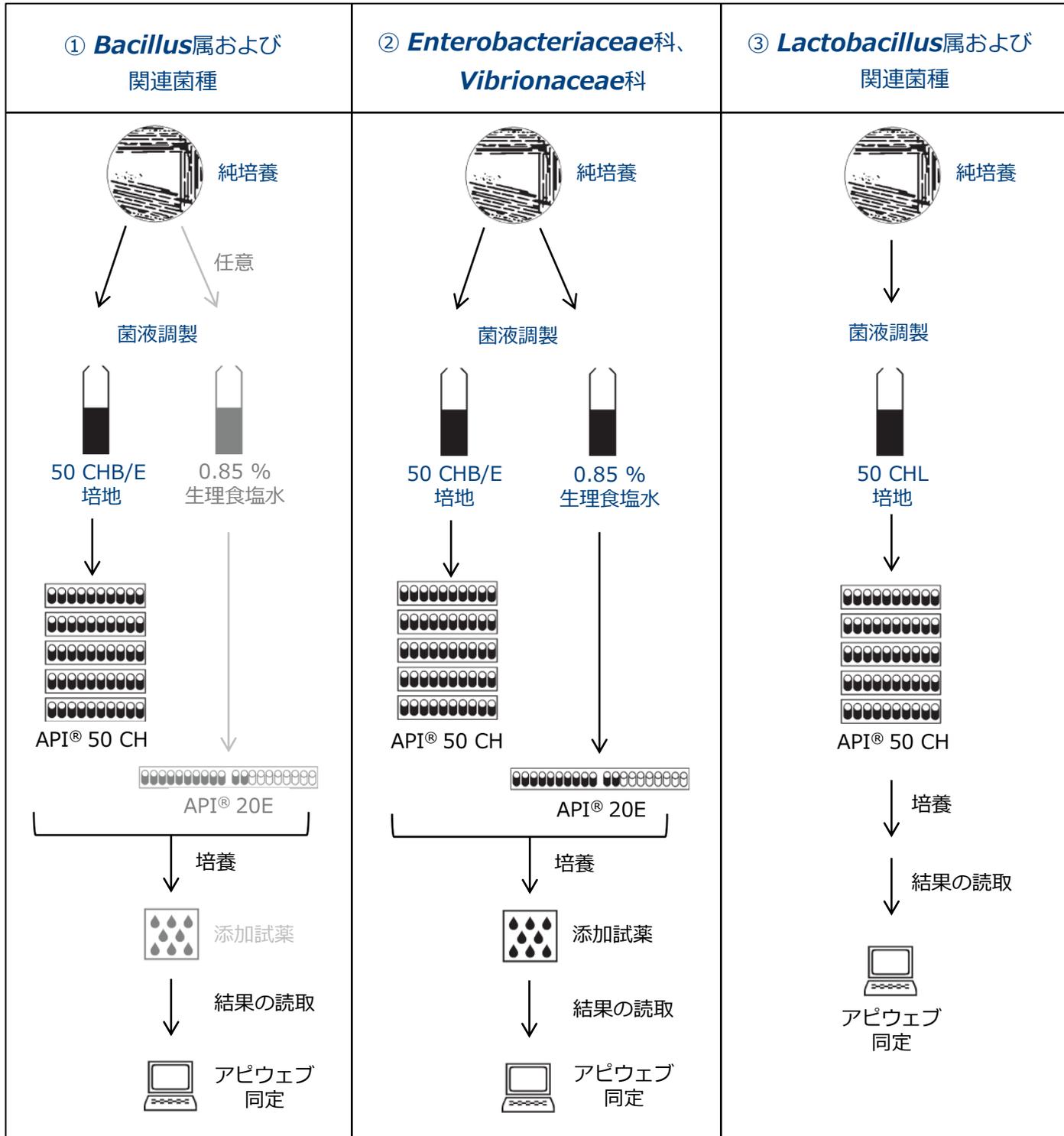
◆ API® 50 CH 以外に必要な試薬 ◆

各菌種の同定で使用する試薬類については、各製品の使用説明書をご参照ください。

◆ APIシリーズをお使いいただく上で必要なもの（全キット共通） ◆

- ・デンシマット(品番: 99234) または マクファーランドスタンダード(品番: 70900)
- ・アピウェブ ライセンス (品番: 424275)

ワークフロー



① *Bacillus*属および 関連菌種の同定 - 1



Step1 コロニーの選択



- ・試験する菌株が純培養であることを確認する。
- ・*Bacillus*属であることを確認する。
(好気性、芽胞形成桿菌、通常グラム陽性など)

◆ 培養条件

菌の特徴	培地	好気/嫌気	培養温度	培養時間
低温菌	普通寒天培地	好気	20 °C	18 - 48 h
中温菌			25 - 45 °C	16 - 18 h
高温菌			55 °C	12 - 16 h



至適温度が分からない場合、遅発育菌、*Bacillus lentus* については、「API® 50 CHB/E 培地」の使用説明書をご参照ください。

Step2 菌液調製



- ・API® 50 CHプレートに接種するための菌液を調製する。
- ・菌液は調製後、直ちに使用する。
- ・菌液は指定のマクファーランド濁度(McF)に調製する。
- ・API®20Eを併用する場合、API®20Eの菌液から調製する。

	API® 50CH 用の菌液調製	API® 20 E 用の菌液調製
デンシマットを使用する場合	<ol style="list-style-type: none"> 1. API® 50 CHB/E 培地のアンプルを開ける 2. コロニー数個を釣菌して、McF 2 になるよう菌液を調製する 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.85%滅菌生理食塩水 (5 mL) のアンプルを開ける 2. コロニー数個を釣菌して、McF 2 になるよう菌液を調製する
マクファーランドスタンダードを使用する場合	<ol style="list-style-type: none"> 1. API® 50 CHB/E 培地のアンプルを開ける 2. API® 20 E用の菌液調製4. の滴下数(n)の倍量(2n)の濃厚菌液(S)を接種してよく懸濁し、均一な菌液を調製する 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 mL滅菌生理食塩水を含む試験管を用意する 2. スワブで培地上の全コロニーを掻き取り、濃厚菌液(S)を調製する 3. 0.85%滅菌生理食塩水 (5 mL) のアンプルを開ける 4. 3.に濃厚菌液(S)を滴下してMcF 2 になるよう菌液を調製する ※(S)の滴下数(n)を記録しておく



0.85%滅菌生理食塩水 (5 mL) またはサスペンションメディウム (5 mL) 、ピオメリュー社製以外の滅菌生理食塩水または滅菌水 (その他の添加物を含有しないもの) 5 mLが入った試験管を使用することも可能

① *Bacillus*属および 関連菌種の同定 - 2



Step3 プレートへの菌液接種

使用するトレイのフラップ部分に、試験する菌株の情報（検体名など）を記入する。



API® 50 CH
プレート

1. トレイに約10 mLの水を入れ、5枚のプレートを1枚ずつ切り離してトレイにセットする。
2. チューブ部分 (①) にAPI® 50 CH用に調製した菌液を接種する。
3. 任意でミネラルオイルを重層 (③) する。



嫌気培養となるため、
偏性好気性菌の場合には重層しない



API® 20 E
プレート
(任意)

1. トレイに約5 mLの水を入れ、プレートをトレイにセットする。
2. 最初の12試験(ONPG~GLU)にAPI® 20 E 用に調製した菌液を接種する。
(残り8試験は使用しない。)



CIT, VP, GEL : チューブ部分とカップ部分 (②) に接種
その他 : チューブ部分 (①) に接種

3. ADH, LDC, ODC, H₂S, UREにミネラルオイルを重層 (③) する。

① チューブ部分への接種

基質名のみ



② チューブ部分とカップ部分への接種

基質名に囲い
例)

[CIT] [VP] [GEL]



③ ミネラルオイルの重層

基質名に下線部
(例) ADH ODC URE



各ウェルへの接種方法は、製品および各製品の使用説明書で
ご確認ください。

① *Bacillus*属および 関連菌種の同定 - 3



Step4 プレートの培養と結果の読み取り



- ・ API® 50 CH およびAPI® 20 E プレートを同一条件で培養する。



- ・ 既定の培養時間にプレートの読み取りを行い、結果を記録する。
- ・ API® 20 Eを併用する場合は、最後の読み取り時に添加試薬を加える。



詳細は、API® 20 EおよびAPI® 50 CHB/E 培地の使用説明書をご参照ください。



読み取り時のポイント

- ・ アピウェブの色見本を参照する。
- ・ API® 50 CHプレートは、項目0(コントロール)を陰性の基準とする。
- ・ 陽性反応が2回目以降の読み取りで陰性になった場合、最終的な判定は陽性とする。



高温菌以外



29 ± 2 °C ・ 好気培養 ④ API® 20 E併用時は添加試薬を添加

培養開始

24 ± 2 h

48 ± 6 h

読み取り
1回目

読み取り
2回目



高温菌



55 ± 2 °C ・ 好気培養 ④ API® 20 E併用時は添加試薬を添加

培養開始

3 - 3.5 h

6 - 6.5 h

24 ± 2 h

読み取り
1回目

読み取り
2回目

読み取り
3回目



産生ガスを補足するため、チューブ底部を上にしてAPI® 50 CHプレートを少し傾けて培養する

Step5 アピウェブによる同定



- ・ プレートの読み取り結果をアピウェブに入力し、同定結果を確認する。



アピウェブへのアクセスにはライセンスが必要です。
詳細な使用方法については、API®ユーザーサポートページをご確認ください。

② *Enterobacteriaceae*科、 *Vibrionaceae*科の同定 - 1



Step1 コロニーの選択



- ・試験する菌株が純培養であることを確認する。
- ・*Enterobacteriaceae*科または*Vibrionaceae*科であることを確認する。

◆ 培養条件

培地	好気/嫌気	培養温度	培養時間
普通寒天培地、 トリプケースソイ寒天培地など	好気	37 °C	18 - 24 h

Step2 菌液調製



- ・API® 50 CHプレートに接種するための菌液を調製する。



- ・菌液は調製後、直ちに使用する。
- ・菌液は指定のマクファーランド濁度(McF)に調製する。

	API® 50CH 用の菌液調製	API® 20 E 用の菌液調製
デンシマットを 使用する場合	<ol style="list-style-type: none"> 1. API® 50 CHB/E 培地のアンプルを開ける 2. コロニー数個を釣菌して、Mcf 0.5 になるよう菌液を調製する 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.85%滅菌生理食塩液 (5 mL) またはサスペンションメEDIUM (5 mL) のアンプルを開ける 2. コロニー1個を釣菌してよく攪拌し、均一な菌液を調製する
マクファーランド スタンダードを 使用する場合	<ol style="list-style-type: none"> 1. コロニー数個を釣菌し、滅菌精製水1 mLに懸濁し、Mcf 4 になるよう菌液を調製する 2. API® 50 CHB/E 培地のアンプルを開ける 3. 1. をAPI® 50 CHB/E 培地のアンプルへ移しいれる 4. よく懸濁し、均一な菌液を調製する (Mcf 0.5 相当) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.85%滅菌生理食塩液 のアンプルを開ける 2. コロニー1個を釣菌してよく攪拌し、均一な菌液を調製する



ピオメリュー社製以外の滅菌精製水または0.85%滅菌生理食塩液（その他の添加物を含有しないもの）5mLが入った試験管を使用することも可能。ただし、*Vibrio*属が疑われる場合は、0.85%滅菌生理食塩液を使用すること。

② *Enterobacteriaceae*科、 *Vibrionaceae*科の同定 - 2



Step3 プレートへの菌液接種

使用するトレイのフラップ部分に、試験する菌株の情報（検体名など）を記入する。

0000000000

API® 50 CH
プレート

1. トレイに約10 mLの水を入れ、5枚のプレートを1枚ずつ切り離してトレイにセットする。
2. チューブ部分 (①) にAPI® 50 CH用に調製した菌液を接種する。
3. 全試験にミネラルオイルを重層 (③) する。

0000000000

API® 20 E
プレート

1. トレイに約5 mLの水を入れ、プレートをトレイにセットする。
2. 最初の11試験(ONPG~GEL)とGLU(NIT反应用)にAPI® 20 E用に調製した菌液を接種する。



CIT, VP, GEL : チューブ部分とカップ部分 (②) に接種
その他 : チューブ部分 (①) に接種

3. ADH, LDC, ODC, H₂S, UREにミネラルオイルを重層 (③) する。

① チューブ部分への接種

0000000000 基質名のみ



② チューブ部分とカップ部分への接種

0000000000 基質名に囲い

例)

| CIT | | VP | | GEL |



③ ミネラルオイルの重層

0000000000 基質名に下線部

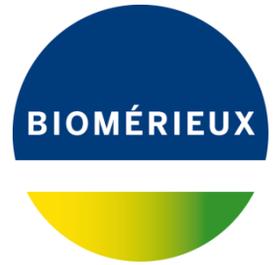
(例) ADH ODC URE

ミネラルオイル



各ウェルへの接種方法は、製品および各製品の使用説明書でご確認ください。

② *Enterobacteriaceae*科、 *Vibrionaceae*科の同定 - 3



Step4 プレートの培養と結果の読み取り



- ・ API® 50 CH およびAPI® 20 E プレートを同一条件で培養する。



- ・ 既定の培養時間にプレートの読み取りを行い、結果を記録する。
- ・ API® 20 Eは、最後の読み取り時に添加試薬を加える。



詳細は、API® 20 EおよびAPI® 50 CHB/E 培地の使用説明書をご参照ください。



読み取り時のポイント

- ・ アピウェブの色見本を参照する。
- ・ API® 50 CHプレートは、項目0(コントロール)を陰性の基準とする。
- ・ 陽性反応が2回目以降の読み取りで陰性になった場合、最終的な判定は陽性とする。



共通



36 ± 2 °C ・ 好気培養

添加試薬を添加

培養開始

24 ± 2 h

48 ± 6 h

読み取り
1回目

読み取り
2回目

Step5 アピウェブによる同定



- ・ プレートの読み取り結果をアピウェブに入力し、同定結果を確認する。



アピウェブへのアクセスにはライセンスが必要です。

詳細な使用方法については、API®ユーザーサポートページをご確認ください。

③ *Lactobacillus*属および

関連菌種の同定 - 1



Step1 コロニーの選択



- ・試験する菌株が純培養であることを確認する。
- ・乳酸菌であることを確認する。
(グラム陽性、カタラーゼ陰性、無芽胞、嫌気性(通性/偏性)、MRS寒天培地で発育)

◆ 培養条件

培地	好気/嫌気	培養温度	培養時間
MRS寒天培地 (品番: AEB621757VAF)	嫌気	30 / 37 °C	24 h



- ・ 培養温度は菌株の由来に合わせて選択する
- ・ 凍結乾燥または凍結保存菌株を試験する場合、MRS寒天培地で2回継代培養を行う

Step2 菌液調製



- ・ API® 50 CHプレートに接種するための菌液を調製する。
- ・ 菌液は調製後、直ちに使用する。
- ・ 菌液は指定のマクファーランド濁度(McF)に調製する。

デンシマットを
使用する場合

1. API® 50 CHB/E 培地のアンプルを開ける
2. コロニー数個を釣菌して、**McF 2** になるよう菌液を調製する

マクファーランド
スタンダードを
使用する場合

1. サスペンションメディウム 2 mL  のアンプルを開ける
2. 滅菌綿棒で培地中のコロニーを全て掻き取り、1. に濃厚菌液(S)を調製する
3. サスペンションメディウム 5 mLのアンプルを開ける
4. 3. に2.の濃厚菌液(S)を滴下して**McF 2** に調製する
※(S)の滴下数(n)を記録しておく
5. API® 50 CHL 培地のアンプルを開ける
6. 4. で記録した**滴下数(n)の倍量(2n)**の濃厚菌液(S)を接種して懸濁し、均一な菌液を調製する



添加物のない滅菌水を使用することも可能

③ *Lactobacillus*属および

関連菌種の同定 - 2



Step3 プレートへの菌液接種

使用するトレイのフラップ部分に、試験する菌株の情報（検体名など）を記入する。



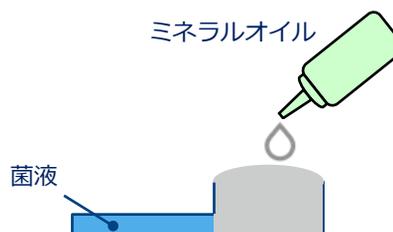
API® 50 CH
プレート

1. トレイに約10 mLの水を入れ、5枚のプレートを1枚ずつ切り離してトレイにセットする。
2. チューブ部分 (①) に調製した菌液を接種する。
3. 全試験にミネラルオイルを重層 (②) する。

① チューブ部分への接種



② ミネラルオイルの重層



Step4 プレートの培養と結果の読み取り



- ・菌株の由来にあわせた培養温度で培養する。



詳細は、API® 50 CHL 培地の
使用説明書をご参照ください。



- ・既定の培養時間にプレートの読み取りを行い、結果を記録する。



読み取り時のポイント

- ・アピウェブの色見本を参照する。
- ・API® 50 CHプレートは、**項目0(コントロール)を陰性の基準**とする。



共通



29 ± 2 °C / 36 ± 2 °C ・好気培養

培養開始

48 ± 6 h

読み取り

Step5 アピウェブによる同定



- ・プレートの読み取り結果を**アピウェブ**に入力し、同定結果を確認する。

参考①

API®ユーザーサポートページ



API®シリーズを使用するときに必要な情報を
集約したサポートページ



サイトにアクセス

(クリックしてリンク先にアクセス)



<https://go.biomerieux.com/JP/API-User-Support-Register>



掲載コンテンツ

▶動画・操作方法

菌液調製～アピウェブの使用法までを動画で解説

▶よくあるご質問

API®シリーズでよくお問い合わせいただく内容をQ&A形式で掲載

▶使用説明書

API®シリーズの最新版使用説明書をダウンロード可能

▶各種使用ガイド

APIシリーズ各キット毎に必要な試薬をまとめた一覧や添加試薬の使用法、アピウェブおよびResource Center(試験成績書取得用)等、API®シリーズを使用するとき便利な各種ガイドを掲載

参考②

API[®] 50 CHのよくあるご質問



陽性または陰性の判定が難しいです。



陰性コントロール(項目0)と比較して少しでも、色の変化が認められたら陽性と判定します。迷う場合には、“?”を入れて検索することも可能です。



Bacillus属および関連菌種を同定する目的では、API20Eのプレートの使用について“任意”とありますが、どのような場合に使用したらいいですか？



API50CHで同定可能な*Bacillus*属の多くはAPI50CHのみで同定可能ですが、一部の菌種や菌株の特性によっては、API50CHのみでは十分な同定結果を得られず、API20Eを併用することで、同定結果が得られる場合があります。

API20Eが必要か否かについては事前に分からないため、いずれかの方法をご検討ください。

- ① 最初からAPI50CHとAPI20Eを併用する
- ② まずはAPI50CHで試験をして結果が得られない場合にAPI20Eを使用する



API50CH (*Bacillus*属) の培養時間について、使用説明書には、“高温菌以外は培養24時間±2時間および48時間±6時間培養します。”とありますが、計72時間培養すればよいですか？
高温菌は、3時間-3時間半、6時間-6時間半、24時間±2時間なので計33時間培養ですか？



高温菌以外：培養開始後、24時間±2時間目と48時間±6時間目のそれぞれの時点で読み取りを行ってください。

高温菌：培養開始後、3時間-3時間半目、6時間-6時間半目、24時間±2時間目のそれぞれの時点で読み取りを行ってください。



API50CH (*Bacillus*属) の試験において、培養24時間、48時間に読み取りを行いましたがある項目で24時間で陽性、48時間で陰性でした。このような場合は、どのように最終判定すればよいですか？



1回目の読み取りで陽性判定で、2回目以降陰性判定であれば、陽性判定とします。



Bacillus属の菌液が作りにくいです。コツはありますか？



*Bacillus*属などの菌液調製時に菌体の塊(フロック)ができやすい場合は、濃い菌液調製をしてフロックを自然沈殿させ、フロックのない上澄みを試験に使用します。



同定結果に“*Bacillus no reactive*”と記載がありました。どのような意味ですか？



*Bacillus*属ですが、陽性反応数が少なく、種レベルの同定が難しい場合に記載されます。種レベルの同定にはAPI以外の手法が必要です。



PIONEERING DIAGNOSTICS