

** ご使用の際は、電子化された添付文書をよくお読みください

大腸菌O157抗原キット

E. coli O157-AD「生研」

【全般的な注意】

1. 本品は、体外診断用医薬品であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
- ** 3. 電子化された添付文書に記載された操作法に従って使用してください。記載された操作法及び使用目的以外での使用については、結果の信頼性を保証致しません。
- ** 4. 使用する機器の電子化された添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。
5. 試薬容器、付属品等は当検査以外の目的に転用しないでください。

【形状・構造等(キットの構成)】

- | | |
|------------------------------|--------|
| 1. 感作ラテックス | 2mL×1本 |
| 抗大腸菌O157マウスモノクローナル抗体感作ラテックス | |
| 保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。 | |
| 2. 対照ラテックス | 2mL×1本 |
| 保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。 | |
| 3. 陽性コントロール | 1mL×1本 |
| 保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。 | |
| 4. 抽出試薬 1 | 5mL×1本 |
| 10vol%酢酸溶液 | |
| 5. 抽出試薬 2 | 5mL×1本 |
| 5mol/L亜硝酸ナトリウム溶液 | |
| 6. 抽出試薬 3 | 5mL×1本 |
| トリス緩衝液 | |

付属品

- | | |
|------------|-----|
| ・綿棒 | 60本 |
| ・遠心チューブ | 55個 |
| ・スライド凝集反応板 | 30枚 |

【使用目的】

大腸菌O157の検出

【測定原理】

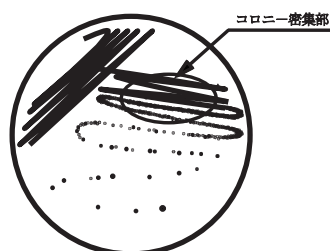
大腸菌O157^{1) 2)} に対する特異モノクローナル抗体を感作したラテックス粒子は、検体中の大腸菌O157と反応して凝集を起こします。本品はこの抗原抗体反応を利用したスライドラテックス凝集反応法を測定原理としています。

【操作上の注意】

測定試料の性質、採取法

1. 大腸菌O157感染症が疑われる患者糞便から大腸菌O157分離用培地で選択・増殖したコロニー又はコロニー密集部、あるいは急性期の患者糞便を検体とします。
2. コロニー密集部からの検体採取は、図を参考に行ってください。
3. 検体採取には必ずキット添付の綿棒を使用してください。
4. 抽出液を保存する場合は、乾燥を避け冷蔵庫(2~10℃)に保存してください。

図.



【用法・用量(操作方法)】

1. 準備する器具、機材
 - 1) マイクロピペット及びチップ(25μL用, 100μL用)
 - 2) 白金線
 - 3) マイクロチューブ用遠心機(900×g以上)
2. 試薬の調製方法
 - 1) 各試薬はそのまま使用します。
 - 2) 使用時には常温(15~25℃)に30分間以上放置してから使用してください。
3. 操作法
本品は、亜硝酸抽出法によって検体を処理した後スライドラテックス凝集反応法で調べる抽出法を基本としますが、個別のコロニーを調べる場合には亜硝酸抽出法を省略した直接法も可能です。ただし、直接法で対照ラテックスに凝集が見られる場合は、抽出法で確認を行ってください。

A: 培養検体からの検出

- 1) 抽出法
大腸菌O157分離用培地上のO157が疑われる個別コロニー又はコロニー密集部を検体とします。
(抽出の際は十分撹拌してください。不十分な場合は偽陽性及び偽陰性を生じる可能性があります。)
(1) 分離培地上のコロニー密集部からマッチ棒の頭程度の検体を付属の綿棒で採取します。個別のコロニーの場合は、1個のコロニーを付属の綿棒で採取します。
(2) 綿棒を遠心チューブに立て、抽出試薬1を2滴滴加します。
(3) 抽出試薬2を2滴滴加した後、綿棒を遠心チューブの壁に押しつけるように回しながら十分に撹拌し、5分間静置します。
(4) 抽出試薬3を2滴滴加し、(3)と同様に十分に撹拌します。
(5) 撹拌後、綿棒を遠心チューブの壁に押し付け綿棒内部の液を絞り出すようにして集め、試料とします。
(6) スライド凝集反応板の2つのサークルに試料を25μLずつ滴加し、チップでサークル全体に広げます。
(7) 2つのサークルの一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを1滴それぞれに滴加します。
(8) スライド凝集反応板を前後左右に2分間揺り動かし、反応を行います。
(9) 反応終了後すぐに十分な光量下でラテックスの凝集を目視で観察します。
(10) 陽性コントロールの1滴ずつを感作ラテックスと対照ラテックスにそれぞれ反応させて試薬及び凝集像を確認します。

2) 直接法

- 大腸菌O157分離用培地上のO157が疑われる個別コロニーを検体とします。
- (1) 2つのサークルの一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを1滴それぞれに滴加します。
 - (2) 検体を白金線に取り、それぞれのサークルに均一に加えます。
 - (3) 白金線を用いて対照ラテックスと検体が均一となるように混和しながらサークル全体に広げます。次いで、感作ラテックスも同様に混和します。
 - (4) スライド凝集反応板を前後左右に2分間揺り動かし、反応を行います。
 - (5) 反応終了後すぐに十分な光量下でラテックスの凝集を目視で観察します。

- (6) 陽性コントロールの1滴ずつを感作ラテックスと対照ラテックスにそれぞれ反応させて試薬及び凝集像を確認します。

B：糞便検体からの検出

抽出の際は十分撹拌してください。不十分な場合は偽陽性及び偽陰性を生じる可能性があります。

- (1) 付属の綿棒で1綿棒量(固形便の場合はマッチ棒の頭1個相当)程度の糞便を採取します。
- (2) 遠心チューブに糞便を採取した綿棒を立て、抽出試薬1及び2をそれぞれ2滴ずつ滴加します。
- (3) 綿棒を遠心チューブの壁に押し付けるように回しながら十分に撹拌し、5分間静置します。
- (4) 抽出試薬3を2滴滴加し、(3)と同様に綿棒を回しながら十分に撹拌します。
- (5) 綿棒を遠心チューブの壁に押し付け綿棒内部の液を絞り出すようにして集め、綿棒を廃棄します。
- (6) 遠心チューブを900×g、20分間(又は2 000×g、5分間)遠心分離し、上清を試料とします。
- (7) スライド凝集反応板の2つのサークルに試料を25 μLずつ滴加し、チップでサークル全体に広げます。
- (8) 2つのサークルの一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを1滴それぞれに滴加します。
- (9) スライド凝集反応板を前後左右に2分間揺り動かし、反応を行います。
- (10) 反応終了後すぐに十分な光量下でラテックスの凝集を目視で観察します。
- (11) 陽性コントロールの1滴ずつを感作ラテックスと対照ラテックスにそれぞれ反応させて試薬及び凝集像を確認します。

【測定結果の判定法】

判定は以下の基準に従って行います。

黒い背景に強い凝集塊が観察されるもの	3+
わずかに白色を帯びた背景に凝集塊が観察されるもの	2+
乳白色の背景に明らかなラテックス粒子の凝集塊が観察されるもの	1+
均一な乳濁を示し、凝集塊が観察されないもの	—

1+以上を凝集とします。

最初に対照ラテックスが凝集していないことを確認します。

判 定 像	判 定
感作ラテックスに凝集が認められるもの	陽 性
感作ラテックスに凝集が認められないもの	陰 性
対照ラテックスに凝集が認められるもの	判定保留

「判定上の注意」

- 1) スライドラテックス凝集反応の反応時間は必ず2分間としてください。反応時間を延長した場合は非特異反応が現れることがあります。
- 2) 直接法で対照ラテックスに凝集が観察され判定保留とされた場合、抽出法で再試験してください。また、抽出法で判定保留とされた場合は、検体の生理食塩液浮遊液(マッチ棒の頭3つ分を0.5mLに浮遊したもの)を100℃、10分間以上加熱処理して再試験してください。
- 3) コロニー密集部及び糞便検体を試験して陽性となった場合、大腸菌O157を分離して確認する必要があります。
- 4) コロニー密集部及び糞便検体を試験したとき、検体中に存在する大腸菌O157が検出感度以下の場合は陰性と判定されます。本法による陰性との成績は大腸菌O157の存在を直ちに否定するものではありません。
- 5) 糞便検体を試験して陰性となった場合は、分離培養により確認してください。
- 6) 大腸菌O157であってもベロ毒素を産生しない株は腸管出血性大腸菌とは扱いません。腸管出血性大腸菌¹⁾との最終判定にはベロ毒素の検出が必要です。
- 7) 大腸菌以外の細菌(*Citrobacter freundii*, *Salmonella*等)の中には、大腸菌O157と同一な抗原を持つ株の存在が知られています。本品は大腸菌O157を検出するものですが、コロニー密集部及び糞便検体中にこれらの株が存在する場合は陽性と判定される可能性があります。したがって本品で陽性との判定は直ちに大腸菌O157の存在を証明するものではなく、必ず生化学的性状試験による同定が必要です。

- 8) 腸管出血性大腸菌にはO157以外にも多くの血清型が存在することが知られています。本品は大腸菌O157を検出するものですが、これらのO157以外の血清型の腸管出血性大腸菌は本品で陰性と判定されます。

【性 能】

1. 感度

下記の感度試験用参照株をHeart Infusion寒天培地^{*1}で37℃、18時間培養後、菌体を生理食塩液に浮遊して121℃、20分間加熱処理し、吸光度(波長650nm)が0.8となるように調製します。これを3倍階段希釈し、それぞれの25 μLを試料としてスライドラテックス凝集法により試験したとき、1:3³以上で陽性と判定されます。

感度試験用参照株

参照株	菌種・血清型
DK-ECR-02	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

※1: Heart Infusion寒天培地の組成(1L中)

ウシ心臓抽出物	500g	相当
ペプトン	10g	
塩化ナトリウム	5g	
寒天	15g	
	pH 7.4	

2. 正確性

下記の特異性試験用参照株をHeart Infusion寒天培地で37℃、18時間培養し、その1綿棒量を検体として試験したとき、陽性株のみが陽性を示し、陰性株は陰性を示します。

特異性試験用参照株

参照株	菌種・血清型
陽性株	
DK-ECR-02	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
DK-ECR-03	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
DK-ECR-04	<i>Escherichia coli</i> O157:H-
DK-ECR-05	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
陰性株	
DK-ECR-01	<i>Escherichia coli</i> O26:H-
DK-ECR-06	<i>Escherichia coli</i> O111:H-
DK-EC-01	<i>Escherichia coli</i> O1:H-
DK-KL-01	<i>Klebsiella</i> Capsular type1

3. 同時再現性

下記の感度試験用参照株をHeart Infusion寒天培地で37℃、18時間培養後、菌体を生理食塩液に浮遊して121℃、20分間加熱処理し、吸光度(波長650nm)が0.8となるように調製します。これを3倍階段希釈し、それぞれの25 μLを試料としてスライドラテックス凝集法により同時に5回試験したとき、すべて1:3³以上で陽性と判定されます。

感度試験用参照株

参照株	菌種・血清型
DK-ECR-02	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

【使用上又は取扱上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 1) 本品で試験を行う被検菌は腸管出血性大腸菌(四種病原体等)の可能性があります。本品でO157抗原陽性と判定された場合は必ず菌株分離後に生化学的性状試験による大腸菌の同定を行ってください。また、腸管出血性大腸菌の確定には、ベロ毒素の産生または遺伝子の確認等、追加試験が必要です。なお、ベロ毒素産生大腸菌O157(腸管出血性大腸菌)と確定された場合、取扱いにあたっては四種病原体等の取扱い基準に従ってください。
- 2) 本品は感染性の臨床検体を対象としていますので、検体の採取、キットの操作、試料及び器具の廃棄の各場面において感染性のあるものとして取扱い、保護具(眼鏡、手袋、マスク等)を着用の上、十分注意して操作してください。なお、大腸菌O157はバイオセーフティレベル(BSL)2に該当します。
- 3) 本品が、誤って目や口に入ったり皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 1) 本品は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。
凍結させた場合、品質が変化して正しい成績が得られないことがあります。また、使用時には常温(15～25℃)に戻してから使用してください。
- 2) ラテックス試薬及び陽性コントロールは、使用の直前に十分攪拌して、均一な懸濁液とし、瓶を垂直に立てて滴加してください。
- 3) 検体相互間の汚染を防ぐため、検体をサンプリングする際、同一チップの使用は避けてください。
- 4) 本品は、指定された条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
- 5) スライド凝集反応板は点線部を折り立てて使用してください。
- 6) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせたり、混ぜ合わせて使用しないでください。また、同一ロットの試薬であっても試薬間の注ぎ足しは測定誤差を生じる原因となりますので避けてください。
- 7) 各試薬のキャップは取り違えないようにしてください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 検体中には、感染性物質が存在する可能性がありますので、検体、廃液、使用済みの容器及び検査に使用したすべての器具類は、次のいずれかの方法で滅菌処理を行ってください。
 - (1) 最終濃度3.5vol%グルタルアルデヒド溶液に、30分以上浸漬する。
 - (2) 0.5w/v%次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素5 000ppm)に、1時間以上浸漬する。
 - (3) 121℃で、20分以上高圧蒸気滅菌をする。
- 2) 構成試薬中の感作ラテックス、対照ラテックス、陽性コントロールは、アジ化ナトリウムを0.08w/v%含んでいます。アジ化ナトリウムは、鉛や銅と反応して爆発性のある重金属アジ化物を生成することがありますので、大量の水とともに廃棄してください。
- 3) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

- 1) 貯蔵方法 遮光して2～10℃に保存
- 2) 有効期間 1年
(外箱、ラベルに表示の使用期限内にご使用ください。)

【包装単位】

コードNo.	品 名	包 装
230652	<i>E. coli</i> O 157 - AD 「生研」	50回用×1箱

【主要文献】

- 1) 坂崎利一ら: *Escherichia* 属、腸内細菌<下巻>、第3版、近代出版、75(1992)。
- 2) Vero毒素産生性大腸菌(腸管出血性大腸菌)感染症1996～1997. 6: 病原微生物検出情報 Vol. 18 No. 7, 153(1997)。

**【問い合わせ先】

*
デンカ株式会社 試薬学術担当
〒103-8338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
フリーダイヤル 0120-206-072
受付時間 9:00～17:00 (土日祝日・弊社休業日を除く)

* 製造販売元

デンカ株式会社
新潟県五泉市木越字鏡田 1 3 5 9 番地 1