

** 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

ノロウイルス抗原キット

NV-EIA「生研」

【全般の注意】

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。

【形状・構造等(キットの構成)】

1. 抗NV^{*1}抗体固相プレート 8ウェル 12本×1パック
抗NV-G I^{*2}モノクローナル抗体(マウス)及び抗NV-G II^{*3}モノクローナル抗体(マウス)をマイクロプレートに固相化(凍結乾燥)したものです。
※1: ノロウイルス; Norovirus
※2: 遺伝子群 I; Genogroup I
※3: 遺伝子群 II; Genogroup II
2. 検体抽出液 110mL ×1本
3. 緩衝液 10mL ×1本
4. 陽性コントロール 2mL分×3本
組換えNV抗原を含む凍結乾燥品です。
5. 酵素標識抗体液 15mL ×1本
ペルオキシダーゼ標識抗NV抗原ポリクローナル抗体(ウサギ)^{*4}、ペルオキシダーゼ標識抗NV抗原モノクローナル抗体(マウス)^{*4}、ペルオキシダーゼ標識抗NV-G IIモノクローナル抗体(マウス)及びペルオキシダーゼ標識抗NV-G II. 1 7モノクローナル抗体(マウス)を含みます。
※4: 抗NV抗体として124型, CV型, 645型, 445型, 10-25型, 104型の抗原型に対するポリクローナル抗体(ウサギ)及び、258型, 1876型の抗原型に対するモノクローナル抗体(マウス)を含みます。
6. 基質液 15mL ×1本
3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(TMB), 過酸化水素(0.009vol%)を含む溶液です。
7. 洗浄原液 (10倍濃度液) 100mL ×1本
8. 反応停止液 15mL ×1本
0.3mol/Lの硫酸です。

付属品

- ・プレートホルダー 1枚

【使用目的】

糞便中のノロウイルス(NV)抗原の検出(NV感染の診断の補助)

【測定原理】

本品は、下記の酵素免疫測定法(EIA法:Enzyme Immunoassay法)を原理としています。
抗NV-G Iモノクローナル抗体(マウス)及び抗NV-G IIモノクローナル抗体(マウス)を平型マイクロプレートに固相化し、NV抗原、ペルオキシダーゼ標識抗NV抗原ポリクローナル抗体(ウサギ)及びペルオキシダーゼ標識抗NV抗原モノクローナル抗体(マウス)を反応させ、酵素活性を測定することにより、検体中のNV抗原を検出します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法
- 1) 検体(糞便)は感染性因子が存在しているものとして扱い、検査実施者や環境等への汚染等がないように充分注意してください。

- 2) 検体中に固形物(未消化物等)が存在する場合は、検体採取時に固形物が混入しないように注意して操作してください。
- 3) 検体に血液が存在する場合は、血液が付いていない部分を採取するなど、できるだけ混入しないようにしてください。
- 4) 検体は、20~30℃にしてから調製してください。
- 5) 新生児由来の検体は、本品の性能確認がされていないため、使用しないでください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

ヘモグロビンは100mg/dLまで、イントラファット®注20%を添加した場合4vol%まで、それぞれ影響は見られませんでした。

【用法・用量(操作方法)】

1. 準備する器具
下記は主な器具です。この他の器具は適宜準備してください。
 - 1) マイクロピペット及びチップ(100µL~1000µL用)
 - 2) マルチチャンネルマイクロピペット及びチップ(100µL~250µL用)
 - 3) 小試験管(容量5mL程度; 希釈検体調製用)
 - 4) 試験管ミキサー
 - 5) 遠心分離機(500~2000×g; 希釈検体調製用(遠心分離の場合))
 - 6) マイクロプレート用ミキサー
 - 7) アスピレーター及び吸引瓶(感染防止のため次亜塩素酸ナトリウムを吸引後に1.0w/v%となるように添加しておきます)
 - 8) ラップ、アルミ箔又は遮光容器(酵素反応遮光用)
 - 9) オートリーダー(マイクロプレート用比色計)
2. 試薬の調製
 - 1) 抗NV抗体固相プレート
そのまま使用します。(以下プレートと略します)
(開封後のプレートは直ちに使用します)
 - 2) 検体抽出液(桃色の溶液)
そのまま使用します。
 - 3) 緩衝液
そのまま使用します。
 - 4) 陽性コントロール(凍結乾燥品)
陽性コントロール1本に緩衝液2mLを加えて溶解し、陽性コントロール液とします。
溶解後は2~10℃に保存し、1週間以内に使用するか、又は、凍結(-20~-80℃)保存し、1箇月以内に使用してください。
ただし、凍結融解は繰り返さないでください。
 - 5) 酵素標識抗体液(青色の溶液)
そのまま使用します。
 - 6) 基質液
そのまま使用します。
 - 7) 洗浄原液(10倍濃度液)
洗浄原液を精製水で10倍に希釈して洗浄液とします。
希釈した洗浄液は、当日中に使用してください。
 - 8) 反応停止液
そのまま使用します。

3. 検体の調製

- 1) 下記の量の検体(糞便)を、小試験管に採取します。検体採取後は速やかに冷蔵又は冷凍で輸送し、検体を処理してください。速やかに処理できない場合は-20℃以下に凍結保存してください。その場合もできる限り早く検体を処理してください。

固形糞便：約0.1g(小豆くらいの大きさ)

液状糞便：約100 μ L

- 検体の入った小試験管に検体抽出液1mLを加え、試験管ミキサーで30秒前後攪拌して懸濁の後、20～30℃で10分間静置するか、又は500～2 000 $\times$ gで5分間遠心します。
- 上清をマイクロピペットで採取して希釈検体とします。なお、当日に検査をしない場合は、希釈検体を2～10℃に保存し、1日以内に検査してください。

4. 操作法

＜抗NV抗体固相プレート準備＞

- プレートの使用ウェル数は、下記になります。

ブランク用	：1ウェル
陽性コントロール用	：2ウェル
希釈検体(各1ウェル)用	：希釈検体数分のウェル

あらかじめ、以上の使用合計ウェル数を求めています。
- 1ストリップは8ウェル連結ですので、検査に必要なストリップ数量は、使用合計ウェル数を8で除した端数切り上げの整数値です。使用する試薬を20～30℃に戻したのち、アルミパックから必要な数量のストリップを取り出し、付属のプレートホルダーにはめ込みます。

＜ステップ1＞希釈検体、陽性コントロール液の滴加

- プレートの各ウェルに、一定順序・一定時間間隔でそれぞれに該当する液100 μ Lを滴加します。

ブランク用1ウェル	：検体抽出液
陽性コントロール用2ウェル	：陽性コントロール液
希釈検体数分ウェル	：希釈検体
- プレートをマイクロプレート用ミキサー(以下「プレート用ミキサー」と略します)で数秒間攪拌後、プレート上面をラップ等で覆い、20～30℃で40分間静置します。

＜ステップ2＞洗浄、酵素標識抗体液の滴加

- 全てのウェルの反応液を＜ステップ1＞と同一順序・同一時間間隔で吸引除去します。
- 全てのウェルに、マルチチャンネルマイクロピペット等で洗浄液250 μ Lを滴加し、プレート用ミキサーで数秒間攪拌後、洗浄液を吸引除去します。この洗浄操作を更に4回繰り返します。ただし、3回目以降は、吸引除去後にプレートを清潔なペーパータオル上で逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に取除きます。
なお、洗浄操作が終了しても希釈検体のウェルに着色又は不溶物が認められる時には、当該ウェルについて着色又は不溶物が観察されなくなるまで洗浄操作を繰り返します。
- 全てのウェルに、＜ステップ1＞と同一順序・同一時間間隔で、酵素標識抗体液100 μ Lを滴加し、プレート用ミキサーで数秒間攪拌します。プレート上面をラップ等で覆い、20～30℃で20分間静置します。

＜ステップ3＞洗浄、基質液の滴加

- 全てのウェルの反応液を＜ステップ1＞と同一順序・同一時間間隔で吸引除去します。
- 全てのウェルに、マルチチャンネルマイクロピペット等で洗浄液250 μ Lを滴加し、プレート用ミキサーで数秒間攪拌後、洗浄液を吸引除去します。この洗浄操作を更に4回繰り返します。ただし、3回目以降は、吸引除去後にプレートを清潔なペーパータオル上で逆さにして叩き、ウェルから洗浄液を完全に取除きます。
- 全てのウェルに、＜ステップ1＞と同一順序・同一時間間隔で、基質液100 μ Lを滴加し、プレート用ミキサーで数秒間攪拌します。プレート上面をラップ等で覆い、さらに全体をアルミ箔等で覆うか、又は遮光容器に収納して遮光し、20～30℃で40分間静置します。

＜ステップ4＞反応停止液の滴加と測定

- 全てのウェルに反応停止液を＜ステップ1＞と同一順序・同一時間間隔で100 μ Lずつ滴加します。
- 反応停止液を滴加後30分以内に、オートリーダー(主波長450nm/副波長600～700nm)で各ウェルの呈色液の吸光度を測定します。

5. 使用者の精度管理及び品質管理

陽性コントロールの吸光度(平均)[Abs.]が下記の条件を満たすことを確認してください。

$$0.15\text{Abs.} \leq \text{陽性コントロール吸光度(平均)} < 0.60\text{Abs.}$$

なお、当該条件を満たさない場合は当該キットを使用しないでください。

また、2ウェルの吸光度が2倍以上異なる場合は、操作の過程でなんらかの誤りが考えられますので、再度試験を行ってください。

各種自動分析装置で測定を行う場合は、各機種種の指定のパラメータに基づき、それぞれの反応条件に従って測定してください。(自動分析装置での反応条件は用手法とは異なる場合があります。)

指定のパラメータ(測定条件)については、各装置メーカーまでお問い合わせください。

【測定結果の判定法】

1. 判定

1) カットオフ値

$$\text{カットオフ値} = \text{ブランクの吸光度} + 0.150$$

2) 判定方法

検体の吸光度がカットオフ値未満の場合は陰性、カットオフ値以上の場合は陽性と判定します。

検体吸光度 < カットオフ値：陰性

検体吸光度 $\geq$ カットオフ値：陽性

2. 判定上の注意事項

- 本品は、EIA法を原理とするNV抗原検出試薬であり、検体中に存在するNV抗原量が、本品の検出感度以下の場合は、陰性と判定されます。
また、本品で使用している各抗NV抗体と検体中のNVの遺伝子型が一致しない場合に、陰性と判定されることがあります。したがって、本品で陰性と判定された場合でも他の検査方法及び臨床所見と合わせて担当医師が総合的に判断してください。
- 本品で陽性と判定された場合でも、細菌又は他のウイルスの混合感染が存在する可能性が否定できませんので、臨床症状より疑われる項目の検査を同時に実施し、それらの結果と組み合わせて担当医師が総合的に判断してください。
- 必要に応じて電子顕微鏡観察又はRT-PCR法等の試験も行ってください。
- NVは五類感染症定点把握疾患の一つである感染性胃腸炎の起因ウイルスです。NV感染症と診断された場合、定点医療機関による届出が必要ですので、個人情報の保護に留意の上で所定の報告を行ってください。
- 反応停止後の呈色液の吸光度は、変動(低下・稀に上昇)が見られることがありますので、呈色液の吸光度の測定は、反応停止後30分以内に行ってください。
- 陽性コントロール及び検体の吸光度の変動を踏まえ、カットオフ値付近を示す検体については、複数回の測定を行う等も含めて判定してください。

【臨床的意義】

NVは胃腸炎を起こす原因ウイルスで¹⁾、G I (遺伝子群 I) と G II (遺伝子群 II) に分けられますが、各遺伝子群には多数の遺伝子型(genotype)が存在することが報告されています^{2) 3)}。

NV感染症の主な症状は、下痢、嘔吐、吐気、腹痛であり、その症状は1～3日持続します。

また、患者の糞便中へのNV排泄は、発症とともに始まり約2週間持続するため、糞便による二次感染が起こり易く、施設内感染、院内感染例の報告も多くあります⁴⁾。

感染性胃腸炎においてNV感染症と診断することにより、適切な治療や感染拡大防止が期待できます⁵⁾。

【性能】

1. 性能

1) 感度試験

管理用陽性検体(組換えNV抗原)を2⁸希釈して試験したとき、2²希釈で陽性を示します。

2) 正確性試験

管理用陽性検体及び管理用陰性検体を用いて試験したとき、管理用陽性検体は陽性を示し、管理用陰性検体は陰性を示します。

3) 同時再現性試験

管理用陽性検体及び管理用陰性検体を用いて4重測定したとき、管理用陽性検体は全て陽性を示し、管理用陰性検体は全て陰性を示します。

4) 最小検出感度(例示)

管理用陽性検体を 2^{-8} 希釈して試験したとき、下記の最小検出感度の成績(一例)が得られます。

検出可能蛋白濃度: 1.9ng/mL^{*5}

※5: ブラッドフォード法による蛋白濃度

5) 交差反応性試験

(1) 細菌

次の下痢症起因菌、腸内常在菌、院内感染及び日和見感染を起こす細菌($1 \times 10^8 \text{CFU}^{*6}/\text{mL}$)との交差反応性は認められませんでした。

Salmonella Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*,

Citrobacter freundii, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*,

Proteus mirabilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*,

Shigella sonnei, *Vibrio parahaemolyticus*,

Candida albicans, *Vibrio cholerae*,

Escherichia coli O6, *Escherichia coli* O78,

Escherichia coli O114, *Escherichia coli* O126

※6: CFU; Colony Forming Unit(コロニー形成単位)

(2) ウイルス

下記の胃腸炎を起こす原因ウイルスとの交差性は、括弧内のウイルス濃度まで認められませんでした。

Adenovirus 40 ($1 \times 10^{6.5} \text{TCID}_{50}^{*7}/\text{mL}$)

Adenovirus 41 ($1 \times 10^{5.5} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

Rotavirus A ($1 \times 10^{5.25} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

※7: Tissue Culture Infective Dose 50

(50%組織培養感染量)

2. 相関性試験(社内資料)

胃腸炎症状を呈した患者糞便及び感染性胃腸炎が疑われた者の糞便、計115検体を対象とし、本品と既承認品1(EIA法)又は既承認品2(イムノクロマト法)との相関を試験した結果、下表のような成績が得られました。

表 1. 相関性 1; 既承認品1

		既承認品 1		
		陽性	陰性	計
本品	陽 性	57	3	60
	陰 性	0	55	55
	計	57	58	115

陽性一致率: $57/57 = 100\%$

陰性一致率: $55/58 = 94.8\%$

全体一致率: $112/115 = 97.4\%$

表 2. 相関性 2; 既承認品2

		既承認品 2		
		陽性	陰性	計
本品	陽 性	58	2	60
	陰 性	3	52	55
	計	61	54	115

陽性一致率: $58/61 = 95.1\%$

陰性一致率: $52/54 = 96.3\%$

全体一致率: $110/115 = 95.7\%$

3. 校正用基準物質

遺伝子組換え微生物より作成した組換え NV 抗原

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 1) ノロウイルスはバイオセーフティレベル2(BSL2)に該当します。本品を用いた試験はBSL2に対応した設備で、検査者の感染防止措置を講じた上で行ってください。
- 2) 試験に用いる検体(希釈検体を含みます; 以下同様)及び検体が接触した容器等は感染性があるものとして取扱い、検体の採取、キットの操作、検体及び検体の接触した容器等の廃棄等において、保護具(眼鏡、手袋、マスク等)を着用の上、充分注意をして操作してください。
- 3) NV感染症等の五類感染症は、隔離、就業制限などの処置は必要ないとされていますが、NV感染症と診断された場合、糞便や嘔吐物による二次感染等の感染拡大を防止するため、医師の適切な指示に従ってください。
- 4) 本品の反応停止液及び呈色液は硫酸を含んでおり、腐食性を有しますのでキットの操作にあたっては保護具を着用して、身体や衣服に付着させないように注意してください。反応停止液、呈色液又は試薬を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措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
- 5) 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。
- 2) 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。
- 3) 製造番号の異なる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。
- 4) 試薬のキャップは取り違えないように注意してください。
- 5) 抗NV抗体固相プレートが入っているアルミパックの封を誤って開封した場合は、直ちに湿気を帯びないようにテープ等でアルミパックの封をして、冷蔵保存(2~10℃)してください。
- 6) ストリップは、使用直前にアルミパックより取り出してください。なお、一部のウェルを使用済みのストリップは、アルミパックに戻さないで廃棄してください。
- 7) プレートのウェルは強くこすらないでください。
- 8) 検体及び酵素標識抗体液を滴加するとき、チップの先端をウェルの壁に付着させないでください。
- 9) 検体相互の汚染を防ぐため、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。
- 10) 試験実施の都度、必ず陽性コントロールを測定してください。
- 11) 試薬の反応温度は、20~30℃の範囲としてください。特に冬季の冷たい机の上、若しくは暖房機器の近く等で検査を行う際には、反応温度が範囲外にならないように注意してください。
- 12) 反応時間は、定められた時間で行ってください。また、操作開始後は速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定となるように操作してください。
- 13) 基質液については以下の点にご注意ください。
 - (1) 別の分注容器(リザーバー等)を使用する際には、基質液専用のものを使用してください。
 - (2) 一度分注容器に移した基質液をボトルに戻さないでください。
 - (3) 青色に自然発色したものは使用しないでください。
 - (4) 窓からの光の強い部屋では、ブラインド等を使用してください。
 - (5) 酵素反応中は遮光してください。
 - (6) 基質液のフタをあけたまま放置しないでください。
- 14) 本品の反応停止液及び呈色液は硫酸を含んでおり、腐食性を有しますので、身体、衣服、器具、機器、机、床等に付着した際は速やかに拭き取り、水で洗い流してください。

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分間以上浸漬する。
 - (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分間以上高圧蒸気滅菌をする。
なお、70vol%エタノールは、NVに対する不活化作用は不十分であるとされているため、滅菌処理には使用しないでください。
- 2) 本品の反応停止液及び呈色液は硫酸を含んでおりますので、廃棄の際は、アルカリで中和するか、若しくは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】

貯蔵方法 遮光して2～10℃に保存

有効期間 1年
(外箱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
325631	NV-EIA「生研」	96回用×1箱

【主要文献】

- 1) 武田直和ら：小型球形ウイルス，食品衛生研究，48(7)，65(1998)．
- 2) 染谷雄一ら：ヒトカリシウイルスの多様性，臨床とウイルス，27(4)，294(1999)．
- 3) Kamata, K. et al.: Expression and Antigenicity of Virus-Like Particles of Norovirus and Their Application for Detection of Noroviruses in Stool Samples, J. Med. Virol., 76, 129 (2005)．
- 4) 井戸田一朗ら：ノーウォーク様ウイルスに起因する，急性胃腸炎の院内集団発生事例について，感染症学雑誌，76(1)，32(2002)．
- 5) 田中智之:改良ノロウイルス抗原検出EIAキットの評価，医学と薬学，61(1)，93(2009)．

**【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