

IDテスト・HN-20ラピッド

ヘモフィルス属、ナイセリア属同定用

【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.測定結果に基づく診断は、臨床症状や他の検査結果等と併せて担当医師が総合的に判断してください。
- 3.添付文書以外の使用方法については保証できませんので、あらかじめご了承ください。

* 【形状・構造等（キットの構成）】

	25 検体用
・ HN プレート	20 穴×25 枚
・ HN ブイヨン	2.5mL×25 本
・ 成績表	13 枚×2 組
・ β-ラクタマーゼ検出試液	3mL×1 本
・ 滅菌流動パラフィン	20mL×1 本

反応系に關与する成分
(HN プレート)

	1 プレート中
L-塩酸アラニン-p-ニトロアニリド	147 μg
p-トリロジン-5-ブロモ-3-インドリルホスフェイト	160 μg
硝酸カリウム	500 μg
尿素	400 μg
L-塩酸オルニチン	2,000 μg
L-トリプトファン	100 μg
4-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド	181 μg
4-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド	181 μg
L-トリフルオロ酢酸プロリン-p-ニトロアニリド水和物	210 μg
γ-グルタミル-p-ニトロアニリド水和物	36 μg
ブドウ糖（無水）	2,000 μg
マルトース水和物	1,000 μg
果糖	1,000 μg
マンノース	1,000 μg
マンニトール	4,000 μg
トレハロース	1,000 μg
白糖	1,000 μg
乳糖	1,000 μg
D-キシロース	1,000 μg
2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド	90 μg
亜硝酸ナトリウム	1 μg
ベンジルペニシリンカリウム	3,200 単位

** 【使用目的】

細菌中のヘモフィルス属、ナイセリア属及びその類縁菌の同定

** 【測定原理】

ID テスト・HN-20 ラピッドは微量テスト法と数値同定法の理論に基づき、20 種の生化学的性状の陽性、陰性の成績から菌種名を同定するシステムです。

【操作上の注意】

操作上の留意事項

- 1.本システムの同定対象菌種以外の菌種をキットに供試した場合、コードなし、あるいは追加テスト（オキシダーゼテストなど）により同定不能となります。
- 2.ID テストのような同定キットにおいては、反応の阻害物質として増菌培養に用いた培地の培地成分の持ち込みがあげられます。特に糖（ブドウ糖）およびそのポリマーを高濃度に含有した培地からの糖類の持ち込みに注意してください。

操作上の注意

- 1.被検菌の分離および増菌
 - 1)被検菌は必ず新鮮な純培養菌を用い、接種菌液濃度、接種菌液量、滅菌流動パラフィン重層量および各試液添加量は所定の濃度・量を厳守してください。
 - 2)検体を血液寒天培地、チョコレート寒天培地、あるいはサイヤー・マーチン培地などの分離培地に塗布して、分離を行います。
 - 3)必要に応じて、血液寒天培地あるいはチョコレート寒天培地で増菌培養を行います。
 - 4)これらの分離・増菌培養は、炭酸ガス培養など最適な条件で行ってください。
 - 5)培地上の被検菌について、あらかじめグラム染色を行いグラム陰性球菌あるいはグラム陰性桿菌であることを確認してください。また、黄色色素産生性、オキシダーゼ、カタラーゼおよび溶血性について確認し、同定の補助とします。
- 2.その他
 - 1)本システムの同定対象菌種以外の菌種をキットに供試した場合、コードなし、あるいは誤同定の原因となります。

【用法・用量（操作方法）】

* 1.接種菌液の調製

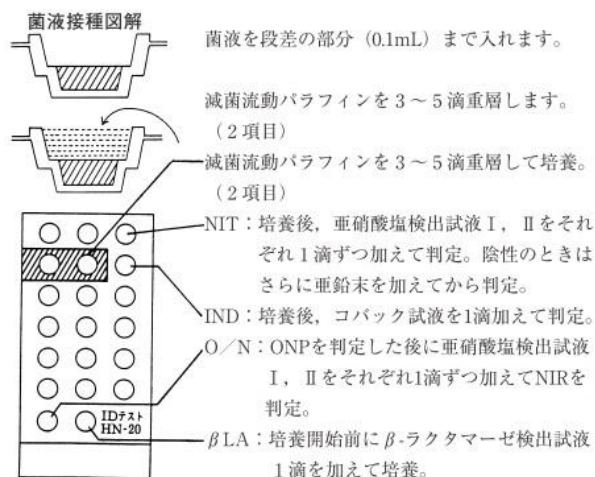
分離・増菌した被検菌を白金耳でとり、HN ブイヨン 1 本に浮遊させます。菌濃度は、グラム陰性桿菌については標準比濁液（菌液 1mL 中に細菌数 9×10^8 個相当：McFarland No.3）と同等の濁度に、グラム陰性球菌については標準比濁液よりも濃厚（菌液 1mL 中に細菌数 1.2×10^9 個以上：McFarland No.4 以上）に懸濁します。

2.菌液の接種

- 1)調製した菌液を滅菌したピペットを用いて吸い上げ、HN プレートの各ホールの段差の部分（0.1mL）まで接種します。
- 2)菌液を接種後、
 - (1)次の 2 項目（記号が白抜きになっています）には、滅菌流動パラフィンを 3~5 滴重層して空気を遮断します。

URE ODC

- (2)β LA の項目には β-ラクタマーゼ検出試液を 1 滴（0.05mL）加えます。



注）被検菌は必ず新鮮な純培養菌を用い、接種菌液濃度、接種菌液量、滅菌流動パラフィン重層量および各試液添加量は所定の濃度・量を厳守してください。

3.培養

1)標準法

プレートにふたをして、好気条件下 35～37℃で 4 時間～4.5 時間（最長 6 時間まで許容）培養します。

注）培養は所定時間を厳守し、許容時間の 6 時間以上は行わないでください。

2)病原ナイセリアのスクリーニング法

(1)本法は、サイヤー・マーチン培地などの病原ナイセリア分離培地に発育した菌についてののみ病原ナイセリアのスクリーニングに適用できます。

(2)プレートにふたをして、好気条件下で 35～37℃で 1 時間培養します。

4.判定

1)標準法

培養後、下記の判定表を参照して陽性、陰性を 1 時間以内に判定します。

項目		強陽性～弱陽性	陰 性
ALA		黄 色	無 色
PHO		青 色	灰 色～無 色
NIT	NO ₂	赤 色	無 色
	N ₂	無 色	赤 色～淡いピンク色
URE		赤 色～ピンク色	橙 色～黄 色
ODC		赤 色	黄 色
IND		赤 色	黄 色～無 色
GLS、PRO、γ GA		黄 色	無 色
GLU～XYL		黄 色	赤 色
O/N	ONP	黄 色	無 色
	NIR	ONP 陽性：黄色（変化なし）、ONP 陰性：無色（変化なし）	赤 色～ピンク色
β LA		糖陽性：黄色、糖陰性：黄色～橙色	赤 色～赤紫色

(1)糖からの酸産生項目（GLU～XYL）がすべて陰性の被検菌（モラキセラなど）については、β-ラクタマーゼ（β LA）の判定は中間の色調でも陽性とします。

(2)下記の 2 項目は培養後、判定用試薬を加えてから判定します。

NIT（NO₂：亜硝酸塩）亜硝酸塩検出試液ⅠおよびⅡをそれぞれ 1 滴ずつ加えて 3～5 分後に判定します。

（N₂：脱窒素）亜硝酸塩陰性の場合には亜鉛末を振って加え、1～2 分後に判定します。

IND コバック試液を 1 滴加えて 1 分以内に判定します。このときホール壁面に沿ってリング状に赤色を呈したのもも陽性とします。

①亜鉛末を加えても赤色～淡いピンク色を呈さないときは N₂ を陽性と判定、最終判定も陽性とします。

PHO	NIT		URE
	NO ₂	N ₂	
	-	+	

→ 陽 性
(4点加算)

* ②亜鉛末を加えたとき赤色～淡いピンク色を呈したときは N₂ を陰性と判定、最終判定も陰性とします。

PHO	NIT		URE
	NO ₂	N ₂	
	-	-	

→ 陰 性

硝酸塩還元（NIT）テストの判定法

亜硝酸塩検出試液Ⅰ、Ⅱを加えたとき、培地が赤色～淡いピンク色を呈したものを陽性と判定します。この場合は亜鉛末による確認は必要ありません。

亜硝酸塩検出試液Ⅰ、Ⅱを加えたとき、培地が赤色～淡いピンク色を呈さなかった場合。

PHO	NIT		URE
	NO ₂	N ₂	
	+	/	

→ 陽 性
(4点加算)

* 硝酸塩還元テストは、培地中の硝酸塩（NO₃）を菌が還元するか否かをみるテストで、還元された亜硝酸塩（NO₂）が培地中に検出されれば判定は陽性とします。しかし、この還元反応は更に NO₂→NO→N₂と進む場合があり、このときも判定は陽性です。ただし、亜硝酸塩検出試液は NO₂ としか反応しないため、この場合培地色調の変化はありません。そこで、亜鉛末を加えることによって NO₃→NO₂ の反応を起こさせて培地中に NO₃ が残存しているか否かを確認する必要があります。亜鉛末の添加によって残存 NO₃ が検出されなかった場合は、すべての NO₃ が消費されたとして硝酸塩還元テスト陽性と判定します。

(3)O/N (ONP/NIR) のホールは、培養後最初に ONP を 1) の判定表を参照して陽性、陰性を判定します。
次に亜硝酸塩検出試液 I および II をそれぞれ 1 滴ずつ加え 3～5 分後に NIR を判定します。

亜硝酸塩還元テスト (NIR, O/N のホール) の判定法

亜硝酸塩還元テストは、O/N のホールについて、ONP を判定した後に、亜硝酸塩検出試液 I, II を加えて判定します。

亜硝酸塩検出試液 I, II を加えたとき、3～5 分後に、ホール内の培地が試液添加前と比較して無変化のときに陽性としします。

①ONP 陽性のとき：ONP 陽性の黄色を呈したまま無変化のとき陽性

②ONP 陰性のとき：ONP 陰性の無色のまま無変化のとき陽性

亜硝酸塩還元テスト陰性は、ONP の陽性、陰性にかかわらず、赤色～淡いピンクを呈します。

* 亜硝酸塩還元テストは、培地中の亜硝酸塩 (NO₂) を菌が還元するか否かを見るテストです。亜硝酸塩が還元されたとき (亜硝酸塩還元陽性) には、培地中には亜硝酸塩が存在しないため、亜硝酸塩検出試液と反応せず、培地色調の変化は見られません。この場合、硝酸塩還元テストのように亜鉛末を加える必要はありません。
なお、硝酸塩を還元しても亜硝酸塩は還元しない菌や、硝酸塩は還元せず亜硝酸塩は還元する菌も存在するため、硝酸塩還元テストの結果とは異なります。

2)病原ナイセリアのスクリーニング

1 時間培養後、1)の判定表を参照して陽性、陰性を判定します。

病原ナイセリアのスクリーニングは、下記 3 項目のみにて判定し、必要であればさらに培養を続け、上記標準法にて判定します。

PRO, γGA, ONP

5.成績の記録

1)標準法

(1)プレート上で判定した 20 項目および β-ラクタマーゼテストの結果を陽性は＋、陰性は－と、添付の成績表に記入します。

(2)成績表は、β-ラクタマーゼテストを除く生化学的性状の 20 項目を次のように 3 性状ずつ集めて 7 群に分けてあります。

点数	1 群	2 群	3 群	4 群	5 群	6 群	7 群
1	アラニンアミノ ペプチダーゼ (ALA)	尿素 (URE)	グルコシダーゼ (GLS)	ブドウ糖 (GLU)	マンノース (MAS)	白糖 (SUC)	β-ガラクト シダーゼ (ONP)
2	ホスファターゼ (PHO)	オルニチン (ODC)	プロリンアミノ ペプチダーゼ (PRO)	マルトース (MLT)	マンニトール (MAN)	乳糖 (LAC)	亜硝酸塩還元 (NIR)
4	硝酸塩還元 (NIT)	インドール (IND)	γ-グルタミル アミノペプチ ダーゼ (γGA)	果糖 (FRU)	トレハロース (TRE)	キシロース (XYL)	

(3)各テストの成績はすべて数字で表し、陰性はすべてゼロ、陽性は群ごとに次のように点数を与えます。

・各群の最初のテスト (例えばアラニンアミノペプチダーゼ、尿素など) には 1 点

・各群の 2 番目のテスト (例えばホスファターゼ、オルニチンなど) には 2 点

・各群の 3 番目のテスト (例えば硝酸塩還元、インドールなど) には 4 点

(4)各テストの点数を群ごとに合計して記入し、それぞれを連結させると、被検菌の生化学的性状は 7 けたの数字にコード化されます。

2)病原ナイセリアのスクリーニング

1 時間培養後プレート上で判定した 3 項目の結果を陽性は＋、陰性は－と添付の成績表に記入します。

6.菌種の選択

1)標準法

20 項目の生化学的性状の成績から得られたコード (プロファイル: 7 けたの数字) を、人からの分離菌ならば ID テスト・HN-20 ラピッド解析プロファイルの A (通常、人由来検体から分離される菌種ファイル) に、それ以外の検体由来のときには解析プロファイルの B (人由来検体からの分離がまれな菌種ファイル) に照合することにより、菌種を選択します。菌種選択の詳細は、ID テスト・HN-20 ラピッド解析プロファイルを参照してください。

2)病原ナイセリアのスクリーニング

病原ナイセリアは、スクリーニング用 3 項目に対し下記のような反応性を示します。

病原ナイセリア	PRO	γGA	ONP
<i>Neisseria meningitidis</i>	－※	＋	－
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	＋	－	－
<i>Neisseria lactamica</i>	＋	－	＋
<i>Moraxella catarrhalis</i> (<i>Branhamella catarrhalis</i>)	－	－	－

* ※*Neisseria meningitidis* の PRO は (－) と表示していますが、臨床分離株の中にはわずかながら陽性株も確認されているため、PRO の (＋), (－) にかかわらず γGA が (＋) と判定された場合は *Neisseria meningitidis* を同定菌名として選択します。

病原ナイセリア判定における留意事項

N.gonorrhoeae は、本来 PRO (プロリンアミノペプチターゼ) 陽性で、本システムにおいても陽性として取り扱っておりますが、近年、英国において PRO 陰性の *N.gonorrhoeae* が報告され、増加傾向にあります。

本システムにおいて、標準法で※1PRO が陰性であるために同定不能あるいは、信用度の低い同定結果 (複数菌名で同定) が得られた場合は、追加試験等による確認が必要です。

スクリーニング法で 3 項目とも陰性の場合、※2*Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* との鑑別を行ってください。

※1.スクリーニング法では PRO (－) で *N.gonorrhoeae* に同定されることはありません。

※2.*M. catarrhalis* はグラム陰性球菌ですので染色等での鑑別は困難です。追加試験としては炭酸ガス要求性試験、DNA 加水分解試験が有効です。

【性能】

* 1. 感度・正確性試験

次の菌株について操作するとき、得られた7けたの数字およびβ-ラクタマーゼテストは次のコードおよび反応を示します。

株 No.	菌種名	1 群	2 群	3 群	4 群	5 群	6 群	7 群	β LA※
HN-1	<i>Haemophilus influenzae</i>	7	7	0	1	0	4	0	+
		7	7	0	5	0	4	0	+
HN-2	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	7	2	0	7	1	1	1	—
HN-3	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1	0	2	1	0	0	0	—
HN-4	<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0	4	0	0	0	0	—
		1	0	4	1	0	0	0	—
		1	0	4	3	0	0	0	—
HN-5	<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>	5	0	0	0	0	0	2	+

(HN-1～HN-5：社内管理用臨床分離株)

※：β-ラクタマーゼテスト

2. 再現性試験

1. に示した菌株を3回同時に測定するとき、得られた7けたの数字およびβ-ラクタマーゼテストは上記1. に示すコードおよび反応に一致します。

3. 相関性

従来の試験管法による同定と比較して、90%以上の同定一致率を示します。

【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) 試薬などが目や口に入った場合には、水で十分に洗い流し、医師等に相談し、指示を受けてください。
- 2) 微生物の取扱いは常に感染の危険性があるので、取扱いにあたっては熟練した人の指導のもとに、バイオハザード対策を実施したうえで使用してください。
- 3) 検体に接触した器具、試薬および試薬容器などは感染の危険があるものとして取扱ってください。

2. 使用上の注意

- 1) 使用期限を過ぎた試薬は同定の信頼性が保証できないので使用しないでください。
- 2) 使用前に異物混入等の異常が認められたものは使用せずに製造販売元まで連絡してください。
- 3) 袋から取り出したHNプレートはその日のうちに使用しない場合は、デシケータなどの乾燥した環境で暗所に保管してください。
- 4) IDテストの使用の際には解析プロファイルが必要です。解析プロファイルについては下記問い合わせ先にご連絡ください。

3. 廃棄上の注意

使用後の培地・試薬・器具等は、オートクレーブ等で滅菌したのち、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物または産業廃棄物等に区分して処理してください。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法

室温に保存（ただし、30℃以上の場所はさけてください）。

有効期間

製造後1年間。

【包装単位】

IDテスト・HN-20ラピッド（25検体用）・・・ Code 06635
HN 試薬（100検体）・・・ Code 06640

【主要文献】

1. Killian, M., Frederiksen, W. and Biberstein, E. L. (ed.): *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, Academic Press Inc., London, 1981
2. Garriety, G. M. et al. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd edition vol.2, Springer-Verlag, USA, 2005
- * 3. Lennette, E. H. (ed.): *Manual of Clinical Microbiology* 6th Edition, ASM, USA, 1995
4. Mutters, R., Piechulla, K. and Mannheim, W.: Phenotypic differentiation of *Pasteurella sensu stricto* and the *Actinobacillus* group. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 3: 225～229, 1984
5. Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. and Mannheim, W.: Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 309～322, 1985

【問い合わせ先】

島津ダイアグノスティクス株式会社
カスタマーサポート担当
〒110-0005
東京都台東区上野 3-24-6
電話 03(5846)5707

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

島津ダイアグノスティクス株式会社
〒110-0005
東京都台東区上野 3-24-6
電話 03(5846)5611（代）