

# バイダス UP アッセイキット 大腸菌 O157:H7(ECPT)

VIDAS UP *E. coli* O157 (including H7) (ECPT)品番 **30122**

特異的ファージキャプチャー技術を基にして開発されたバイダス UP アッセイキット大腸菌 O157:H7 (ECPT) は、バイダスシステムを使った自動定性試験により、食品、土壌、環境試料中の *Escherichia coli* O157 を検出します。

*Escherichia coli* O157:H7 は、腸管出血性大腸炎の原因菌として、国内、米国、カナダ、英国、ベルギーなどの大規模な食中毒事件に関与したことで知られています (1, 2)。主な感染源は生牛肉ですが、他にもミルク、アップルサイダー、生野菜サラダ、ホウレン草などが報告されています。

*E.coli* O157:H7 感染は、深刻な痙攣性腹痛および出血性下痢を引き起こし、約 10% のケースで急性腎不全（溶血性尿毒症症候群）へと進行します。主に 5 歳未満の子供および高齢者で重篤な症状を引き起こします (3)。

本キットは、組換えファージ tail fiber タンパクを使用して迅速な *E.coli* O157 のスクリーニング法として開発されました。最近の研究では、非運動性 *E.coli* O157 株に病原性遺伝子を保有しているものが見つかっており (4, 5, 6)、また、本キットでも非運動性 *E.coli* O157 が検出可能であることが確認されています。

## ■原理

本キットは、酵素蛍光測定法 (ELFA) を原理とし、自動機器バイダスシステムとともに使用します（ユーザーマニュアルを参照）。

ピペット機能を有する固相化スパー (SPR: Solid Phase Receptacle) は、内壁に組換えファージ tail fiber タンパクが固相化されています。分析用試薬は調製済みで、試薬ストリップに予め封入されています。

装置によって全ての分析工程が自動的に行われます。反応試薬はスパー内を数回循環します。

増菌培養液の一部を試薬ストリップに分注します。測定が開始されると、スパー内に固相された組換えファージ tail fiber タンパクによって、試料中の *E.coli* O157 を捕らえ、洗浄ステップで非結合物質を除去し、アルカリフォスファターゼ標識抗 O157 酵素標識抗体をスパーで吸引排出を繰り返すことでスパー内壁の組換えファージ tail fiber タンパク結合 *E.coli* O157 に結合します。さらに洗浄ステップで、非結合抗 O157 酵素標識抗体を除去し、最後の検出ステップで蛍光基質 (4-メチルウンベリフェリリン酸) をスパーで吸引排出を繰り返します。抗 O157 酵素標識抗体に標識された酵素は、蛍光基質の加水分解を触媒し、蛍光物質 (4-メチルウンベリフェ

ロン) が産生され、450 nm で蛍光強度を測定します。測定の最後に、結果の分析が行われ、測定値 (TV) を保存されている基準値 (閾値) と比較して、判定結果 (陽性または陰性) を各試験試料毎に報告します。

### ※※■キット構成 (30テスト)

ECPT 試薬ストリップ (30本)	STR	調製済み
ECPT スパー (30本)	SPR	調製済み スパー内壁に組換えファージ tail fiber タンパクを固相
ECPT スタンダード (1本×6 mL)	S1	調製済み 精製不活化 <i>E.coli</i> O157膜抽出物+防腐剤+タンパク安定化剤 信頼区間は、MLE カードの“Standard(S1)RFV Range”の後に記載されています。
ECPT 陽性コントロール (1本×6 mL)	C1	調製済み試薬 精製不活化 <i>E.coli</i> O157膜抽出物+防腐剤+タンパク安定化剤 信頼区間は、MLE カードの“Control C1 (+) Test Value Range”の後にあります。
陰性コントロール (1本×6 mL)	C2	調製済み TRIS 緩衝生理食塩水 (TBS) (150 mmol/L) -ポリソルベート20 pH7.6+防腐剤 検査の最大許容値は、MLE カードの「コントロール C2 (ー) 検査値の範囲」の後に記載されています。
キャリブレーション用 ・外箱ラベルに印刷されているMLEバーコード		
添付文書を封入していますが、以下からダウンロード可能です。 <a href="http://products.sysmex-biomerieux.net/">http://products.sysmex-biomerieux.net/</a>		

#### ● スパー

スパー内壁には、組換えファージ tail fiber タンパクが固相化されており、ECPT 項目コードで識別されています。

使用時は、パウチからスパーを必要数のみ取り出し、**開封後はパッケージをしっかりとは再密封して下さい。**

#### ● 試薬ストリップ

試薬ストリップには10個のウエルがあり、各ウエルはラベルが貼付されたホイルシールで覆われています。ラベルにはバーコードが印刷されており、主に測定コード、キットのロット番号および使用期限の情報が含まれています。最初のウエルのホイルには、検体を分注するために穴が開いています。最後のウエルは蛍光強度の読取りが行われるキュベットです。中間のウエルは、測定に必要な各種試薬が注入されています。

## ※※ ● ECPT 試薬ストリップの構成内容

ウェル	試薬
1	サンプルウェル： 増菌培養液、スタンダードまたはコントロールを 500 $\mu$ L 分注
2	予洗緩衝溶液 (400 $\mu$ L)： TBS (150 mmol/L) -ポリソルベート 20 pH7.6 + 防腐剤
3-4-5-7-8-9	洗浄緩衝溶液 (600 $\mu$ L)： TBS (150 mmol/L) -ポリソルベート 20 pH7.6 + 防腐剤
6	抗 O157 酵素標識抗体 (400 $\mu$ L)： アルカリフォスファターゼ + 防腐剤
10	基質用読取りキュベット (300 $\mu$ L)： 4-メチルウンベリフェリルリン酸 (0.6 mmol/L) + ジエタノールアミン* (DEA) (0.62 mol/L または 6.6%、pH9.2) + 防腐剤

### 危険有害性情報

H318： 重篤な眼の損傷

### 安全対策注意書き

P280： 保護手袋／保護衣／保護眼鏡／保護面を着用すること

P305+P351+P338： 眼に入った場合： 水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。安全情報の詳細については、お問い合わせ下さい。

## ※ ■ その他必要な試薬、器具および消耗品

- ・ 自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダス
- ・ 適量を分注するためのディスポーザブルピペット  
および (または) マイクロピペット
- ・ 環境用スワブ／スポンジ
- ・ バイダス Heat and Go (品番93554または93555または93556： お問い合わせ下さい)  
またはウォーターバス (95-100°C) もしくは同等品
- ・ バドル式ブレンダー
- ・ フィルター付ブレンダーバッグ
- ・ バイダス ICE O157確認用キット (品番30526、30テスト用)
- ・ セフスロジン
- ・ セフィキシム
- ・ バンコマイシン
- ・ ペプトン緩衝溶液
  - 225 mL ボトル (品番42043)
  - 90 mL ボトル (品番42042)
  - 9 mL 試験管 (品番42111)
- ・ CT サプリメント (CT-M) (品番42606)
- ・ CT - SMAC 寒天培地 (品番43391)

その他の器具および消耗品の詳細は、装置のユーザーマニュアルを参照して下さい。

## ※※ ■使用上の注意

- ・熟練者が使用して下さい。
- ・装置は微生物分析用の試験室に設置して下さい。
- ・GLP（Good Laboratory Practice：医薬品安全性試験実施基準）を遵守して下さい。  
例；ISO7218標準法（3）
- ・*Escherichia coli* O157：H7は、カテゴリリー3Tに該当します。検体は、各規則に従い通常の安全措置のもと取扱う必要があります。
- ・本製品は動物由来の原料を含みます。由来に関する知識、由来動物の衛生状態は感染性のある病原性因子が含まれていないことを保証するものではありません。これらは潜在的に感染の可能性があるものとして、十分注意の上お取り扱い下さい（摂取または吸入しないで下さい）。
- ・スパーのパウチに穴が開いていたり、密封されていない場合は使用しないで下さい。
- ・ストリップに劣化（ホイルまたはプラスチックの損傷）が認められる場合は使用しないで下さい。
- ・ラベルに記載された使用期限を過ぎている試薬は使用しないで下さい。
- ・異なるロットの試薬（または消耗品）を混合して使用しないで下さい。
- ・本製品の試薬はアジ化ナトリウムを含有しており、鉛または銅と反応して爆発性の金属アジ化物を生成する可能性があります。アジ化ナトリウムを含有する液体を下水道に廃水する場合は、金属アジ化物が生成されないように水で洗い流して下さい。
- ・ウエル10の基質は刺激性物質（6.6%ジエタノールアミン）を含有します。上述の危険有害性情報を示す「H」および安全対策注意書きを示す「P」を参照して下さい。
- ・試薬がこぼれた場合、液体洗剤または0.5%以上の次亜塩素酸ナトリウムを含む家庭用漂白剤を使用し、完全に拭き取って下さい。装置の内外に飛散した試薬を拭き取る場合は、ユーザーマニュアルを参照して下さい。漂白剤を含む溶液はオートクレーブしないで下さい。
- ・装置は定期的に清浄し、汚染を除去して下さい（ユーザーマニュアルを参照）。

## ■貯蔵条件

- ・本製品は2-8℃で保管して下さい。
- ・試薬を冷凍しないで下さい。
- ・未使用の試薬は2-8℃で保管して下さい。
- ・キットを開封した際、スパーのパウチが正しく密封されており、損傷がないことを確認して下さい。不具合が確認された場合は、使用しないで下さい。
- ・使用後、スパーの安定を維持するため、乾燥剤と共に封をして2-8℃で保管して下さい。
- ・推奨どおりの保管を実施することで、ラベルに記載された使用期限まで安定して保管することができます。
- ・スパーの安定性を保つため、使用後はパウチに乾燥剤を入れ、しっかりと再密封した後、キット全品を2-8℃に戻して下さい。
- ・推奨条件に従って保管すれば、構成は全てラベルに記載された使用期限まで安

定しています。

## ※ ■ 検体調製

以下のプロトコールを推奨します。

使用前に増菌培地を室温（18-25℃）に戻して下さい。

冷凍検体は、事前に解凍して下さい。

培養条件は、短時間検出方法に影響を与えることがあります。指定の培養温度を厳守して下さい。特に、予め加熱しておく作業は、指定の培養温度に達するために有効です。検体調製時間（予め加熱した状態の増菌培地から検体を加えて培養を開始するまでの間）が45分を越えないようにして下さい。

### NF VALIDATION 承認法 (BIO-12/25-05/09)

#### ※ ● 生牛肉および子牛肉（味付け肉を含む）25 g の試験操作手順

・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。

- 検体 X g

- 検体の9倍量のペプトン緩衝溶液（**予め41.5 ± 1℃に加熱したもの**）

・パドル式ブレンダーで混和して下さい。

・41.5 ± 1℃で7-24時間培養して下さい。

・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。

バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液を0.5 mL 分注し、5 ± 1 分間加熱します（バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照）。加熱後、試薬ストリップを取り外し、10分以上放置して下さい。

ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り、蓋をして95-100℃で5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、**混和せずに**試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL 分注します。

**注記：**加熱後、検体が凝集している場合は、ポルテックスで培養液を混和して下さい。

・バイダスで測定して下さい。

**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8℃で48時間保存可能です。

・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8℃で増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

#### ※※ ● 生牛肉および子牛肉（味付け肉を含む）25 g の試験操作手順（バイダス SPT との手順）

・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。

- 検体 X g

- 検体の9倍量のペプトン緩衝溶液（**予め41.5 ± 1℃に加熱したもの**）

+バンコマイシン（8 mg/L）

注意1：10倍に希釈したペプトン緩衝液を指標菌の生菌数測定に用いる場合は、ISO 7218の推奨事項に従ってください（7）。最初にサンプルを計量する際に考慮に入れ、サンプル量を取ります。サンプリ

ングはサプリメントやバンコマイシンを追加する前に実施してください。

注意 2：同じテストサンプルを用いて指標菌の生菌数測定を実施しない場合は、サプリメントやバンコマイシンを直接ペプトン緩衝液に注入できます。

- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。
- ・41.5 ± 1 °C で16-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液を0.5 mL 分注し、5 ± 1 分間加熱します(バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照)。加熱後、試薬ストリップを取り外し、10分以上放置して下さい。  
ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を2-3 mL 取り(加熱後、検体が凝集している場合は、多目に加熱してください(10 mL))、蓋をして95-100°C で5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、沸騰した培養液をボルテックスで混和し、試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL 分注します。
- ・バイダスで測定して下さい。  
**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8 °C で72時間保存可能です。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。  
**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8 °C で増菌培養液を保存して下さい。培養後72時間以内に確認試験を実施して下さい。

※ ● 生牛肉 および子牛肉(味付け肉を除く) 50-375 gの試験操作手順(バイダス SPT との手順)

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 X g
  - 検体の3倍量のペプトン緩衝溶液(予め41.5 ± 1 °C に加熱したもの)  
+バンコマイシン(8 mg/L)
- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。
- ・41.5 ± 1 °C で8-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
試験管に増菌培養液を2-3 mL 取り、蓋をして、95-100°C で5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、**混和せず**に試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL分注します。  
**注記：**加熱後に検体が凝集している場合、またはバイダス UP アッセイキット サルモネラ(SPT)法と共通のプロトコルを用いる場合は、ボルテックスで培養液を混和して下さい。
- ・バイダスで測定して下さい。  
**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8 °C で48時間保存可能です。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。  
**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8 °C で増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

※ ● 食品全般（生乳、生乳チーズ、生野菜を除く）および製造環境検体の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 X g (X mL)  
**注記**：25 g を超える量の検体は試験しないで下さい。
  - 検体の9倍量のペプトン緩衝溶液（**予め41.5 ± 1 °Cに加熱したもの**）  
+バンコマイシン（8 mg/L）
- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。
- ・41.5°C ± 1 °Cで15-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Goを使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液を0.5 mL 分注し、5 ± 1 分間加熱します（バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照）。加熱後、試薬ストリップを取り外し、10分以上放置して下さい。  
**注記**：卵製品および家禽検体にはバイダス Heat and Go を使用しないで下さい。  
ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り、蓋をして、95-100°Cで5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、ボルテックスで混和し、試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL 分注します。
- ・バイダスで測定して下さい。  
**注記**：非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8 °Cで48時間保存可能です。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。  
**注記**：バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8 °Cで増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

※※ ● 生乳、生乳チーズおよび製造環境検体の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 X g (X mL)  
**注記 1**：環境検体を検査する際は、必要に応じて、適切な中和剤（例：レシチン-ポリソルベート-L-ヒスチジン-チオ硫酸ナトリウム混合物）を含有する滅菌希釈液（例：ペプトン緩衝溶液）で始めに採取器具を湿らせて下さい。検体採取後、サプリメントを添加した適量のペプトン緩衝溶液に器具を入れて下さい（スワブには10 mL、サンプリングパッドには100 mL）。
  - 注記 2**：25 g を超える量の検体は試験しないで下さい。
- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。
- ・41.5°C ± 1 °Cで15-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Goを使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液0.5 mL を移し、5 ± 1 分間加熱します（バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照）。ストリップを取り出し、10分以上冷やします。  
ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り蓋をして、

95-100℃で5 ± 1 分間加熱した後、冷やします。ボルテックスで混和し、ストリップのサンプルウエルに0.5 mL 分注します。

- ・バイダスで測定して下さい。

**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8℃で48時間保存可能です。

- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8℃で増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

#### ※ ● 生野菜の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。

- 検体 X g (X mL)

**注記：**25 g を超える量の検体は試験しないで下さい。

- 検体の9倍量のペプトン緩衝溶液（予め41.5 ± 1℃に加熱したもの）  
+バンコマイシン（8 mg/L）

- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。

- ・41.5 ± 1℃で8-24時間培養して下さい。

- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。

バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウエルに増菌培養液0.5 mL を分注し、5 ± 1 分間加熱します（バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照）。ストリップを取り出し、10分以上冷やします。

ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り、試験管に蓋をして95-100℃で5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やし、ボルテックスで混和してからストリップのサンプルウエルに0.5 mL 分注します。

- ・バイダスで測定して下さい。

**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8℃で48時間保存可能です。

- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8℃で増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

#### NF VALIDATION 適用外の試験操作手順

#### ※ ● 動物用飼料、土壌、飼育環境検体の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。

- 検体 X g (X mL)

- 検体の9倍量のペプトン緩衝溶液（予め41.5 ± 1℃に加熱したもの）  
+バンコマイシン（8 mg/L）+セフィキシム（0.0125 mg/L）  
+セフスロジン（10 mg/L）（VCC）

- ・パドル式ブレンダーで混和して下さい。

- ・41.5℃ ± 1℃で16-24時間培養して下さい。

- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。

バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウエルに増菌培養液を0.5 mL 分注し、5 ± 1 分間加熱します（バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照）。ストリップを取り出し、10分以上冷やします。



ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り、蓋をして95-100℃で5 ± 1 分間加熱した後、冷やします。ボルテックスで混和してからストリップのサンプルウエルに0.5 mL 分注します。

- ・バイダスで測定して下さい。

**注記：**非加熱の増菌培養液は、測定前に2-8℃で48時間保存可能です。

- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

**注記：**バイダスで陽性判定された後、直ちに確認試験を行わない場合は、2-8℃で増菌培養液を保存して下さい。培養後48時間以内に確認試験を実施して下さい。

### ● NF VALIDATION承認方法および適用外方法で得られた陽性結果の確認

本キットで得られた全ての陽性結果について確認する必要があります。

確認は、2-8℃で48時間以内で保存された非加熱増菌培養液を使用します。

増菌培養が7 または 8 時間の場合は、20-24時間まで培養を延長することを推奨します。

次の3種類の有効性が確認されている方法の一つで実施して下さい。：

1. CT-sMAC 寒天培地 (品番 43391) で37 ± 1℃で18-24時間プレートを培養し、*E. coli* O157の特徴をしたコロニーを分離します。  
以下に述べた2つの同定の方法の一つを用いて1-5の典型コロニーを分離して下さい。
2. バイダス ICE で処理したサンプルを (セフィキシムとテルライトを有さない) CT-O157 H7 ID を有する CT-sMAC 寒天培地に塗抹して37 ± 1℃で18-24時間培養し、*E. coli* O157の特徴をしたコロニーを分離します。  
以下に述べた2つの同定の方法の一つを用いて1-5の典型コロニーを分離して下さい。
3. 異なる原理の NF VALIDATION 承認方法で確認試験をすることができます。  
有効性が確認された2つの方法を使用する場合は、全ての条件に従って下さい (例；継続増菌培養)。

確認の方法：

- ・1-5の典型コロニーを、CEN または ISO (精製工程を含む) による標準化された方法で記述されている従来法で同定して下さい。(8)
- ・分離されたコロニー (精製工程なし) を直接ピオメリュー社製ストリップおよびO157ラテックスで試験することができます。

結果が不一致 (代替法で陽性、CEN、ISO または NF による標準法による試験で確認されなかった場合) となった場合、得られた結果が正確であることを確認するための必要なステップを施設で実施する必要があります。例えば、“陽性結果の確認”で最初に使った方法と異なる方法 (1 または 2) を使って再度実施します。

### AOAC RI承認法 (No. 060903)

※ ● 生牛肉および切落とし牛肉25 gの試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 25 g (25 mL)

- ペプトン緩衝溶液 225 mL (予め41.5 ± 1 °Cに加熱したもの)
- ・パドル式ブレンダーで2分間混和して下さい。
- ・41.5 ± 1 °Cで7-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液を0.5 mL 分注し、5 ± 1 分間加熱します(バイダス Heat and Go のユーザーマニュアルを参照)。加熱後、試薬ストリップを取り外し、10分以上放置して下さい。  
ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取り、蓋をして、95-100°Cで5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、混和せずに試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL 分注します。
- ・バイダスで測定して下さい。  
必要に応じて、残りの非加熱増菌培養液を2-8 °Cで保存し、確認試験に使用して下さい。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

※● 生牛肉および切落とし牛肉75-375 gの試験操作手順

- ・検体 (75 gまたは375 g) を無菌的にフィルター付ブレンダーバッグに入れます。  
**注記：**冷凍検体は、事前に解凍して下さい。
- ・ペプトン緩衝液 (予め41.5 ± 1 °Cに加熱したもの) 225 mL または1125 mL + バンコマイシン (8 mg/L) を加えます。
- ・パドル式ブレンダーで2分間混和して下さい。
- ・41.5 ± 1 °Cで8-24時間培養して下さい。  
**注記：**375 gの生牛肉検体は、10-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
試験管に増菌培養液を2-3 mL 取り、蓋をして、95-100°Cで5 ± 1 分間加熱します。試験管を冷やした後、混和せずに試薬ストリップのサンプルウェルに0.5 mL分注します。
- ・バイダスで測定して下さい。  
必要に応じて、残りの非加熱増菌培養液を2-8 °Cで保存し、確認試験に使用して下さい。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

※● かんがい用水の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 25 g
  - ペプトン緩衝溶液 225 mL (予め41.5 ± 1 °Cに加熱したもの)  
+バンコマイシン (8 mg/L) +セフィキシム (0.0125 mg/L)  
+セフスロジン (10 mg/L) (VCC)
- ・パドル式ブレンダーで2分間混和して下さい。
- ・41.5 ± 1 °Cで8-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Go を使用する場合、試薬ストリップのサンプルウェルに増菌培養液0.5 mL を分注し、5 ± 1 分間加熱します(バイダス Heat and Go のユーザー

ザーマニュアルを参照)。ストリップを取り出し、10分以上放冷します。ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取ります。試験管に蓋をして、95-100°Cで5 ± 1 分間加熱した後、放冷します。ボルテックスで混和してからストリップのサンプルウエルに0.5 mL 分注します。

- ・バイダスで測定して下さい。  
必要に応じて、残りの非加熱増菌培養液を2-8°Cで保存し、確認試験に使用して下さい。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

#### ※● 生野菜の試験操作手順

- ・フィルター付ブレンダーバッグに以下を無菌的に入れます。
  - 検体 25 g
  - ペプトン緩衝溶液 225 mL (予め41.5 ± 1°Cに加熱したもの)  
+バンコマイシン (8 mg/L)
- ・パドル式ブレンダーで2分間混和して下さい。
- ・41.5 ± 1°Cで8-24時間培養して下さい。
- ・培養後、ブレンダーバッグの内容物を均一になるように混和して下さい。  
バイダス Heat and Goを使用する場合、試薬ストリップのサンプルウエルに増菌培養液0.5 mL を分注し、5 ± 1 分間加熱します(バイダス Heat and Goのユーザーマニュアルを参照)。ストリップを取り出し、10分以上放冷します。ウォーターバスを使用する場合、試験管に増菌培養液を1-2 mL 取ります。試験管に蓋をして、95-100°Cで5 ± 1 分間加熱した後、冷やします。ボルテックスで混和してからストリップのサンプルウエルに0.5 mL 分注します。
- ・バイダスで測定して下さい。  
必要に応じて、残りの非加熱増菌培養液を2-8°Cで保存し、確認試験に使用して下さい。
- ・結果が陽性の場合、確認試験を行って下さい。

#### ● AOAC RI承認方法で得られた陽性結果の確認

本キットで得られた全ての陽性結果について確認する必要があります。

確認は、**2-8°Cで保存された非加熱増菌培養液**を使用します。

次の2つの有効性が確認された方法のうち一つの方法に従います：

1. CT-sMAC 寒天培地で37 ± 1°Cで18-24時間培養し、*E.coli* O157の特徴を示したコロニーを分離します。
2. バイダス ICE で処理したサンプルを CT-sMAC 寒天培地に塗抹して37 ± 1°Cで18-24時間培養し、*E.coli* O157の特徴を示したコロニーを分離します。

典型コロニーは、USDA 法 (11) または FDA/BAM リファレンス法 (12) で確認して下さい。

#### ※※■ 使用方法

詳細はユーザーマニュアルを参照して下さい。

## ● バイダスPTCプロトコルデータ及びMLEデータの読取り

初めて使用する際は、装置の外付けバーコードリーダーで

1. PTCバーコード（本添付文書の最後に記載）をスキャンして下さい。これによりバイダスPTCプロトコルデータが装置のソフトウェアに転送されて更新されます。

### 2. MLEデータの読取り

**注記：バイダスPTCプロトコルの入力前にMLEデータを読み取ってしまった場合は、MLEデータを再度読み取って下さい。**

## 新規のロットを使用する際

MLEデータを用いて仕様データ（または工場用マスターデータ）を装置に入力して下さい。**測定開始前**にこの操作を実施しない場合、結果を出力することができません。マスターロットデータは、各ロットにつき1回のみ入力する必要があります。

MLEデータは装置に応じて手動または自動で入力します（ユーザーマニュアルを参照）。

## ● キャリブレーション

新しいロットの試薬を開封する際は、必ずマスターロットデータを入力してからキットのスタンダードを用いてキャリブレーションを実施して下さい。その後は14日間隔で実施して下さい。この操作により、装置特有のキャリブレーション情報が得られ、キットの使用期限内の測定シグナルのわずかな変動を補正することができます。

スタンダードS1は**二重測定**して下さい（ユーザーマニュアルを参照）。スタンダードの値は、規定のRFV「**相対蛍光強度**」の範囲内であることが必要です。範囲外の値を示す場合は、再度キャリブレーションを実施して下さい。

## ※ 操作手順

1. 冷蔵庫から必要な試薬のみを取り出し、30分以上室温で放置して下さい。
2. 検体、コントロールまたはスタンダードを試験する際は、各々に対し「ECPT」ストリップ1本および「ECPT」スパー1本を使用します。**必要なスパーを取り出したら、必ず保存用パッケージをしっかりと密封して下さい。**
3. 試験は装置の「ECPT」コードで識別されます。スタンダードは「S1」で識別され、**二重測定**されます。  
陽性コントロールを試験する場合、「C1」で識別します。  
陰性コントロールを試験する場合、「C2」で識別します。
4. 必要に応じて、ボルテックスでスタンダードおよびコントロールを混合し、**500 $\mu$ L**をサンプルウエルに分注して下さい。  
**注意：スタンダードおよびコントロールは加熱しないで下さい。**
5. 加熱工程および検体をストリップに移す手順に関しては、使用した方法を参照して下さい。
6. スパーおよび試薬ストリップを装置にセットして下さい。スパーおよび試薬

ストリップの測定コード（カラーラベルに記載）が一致していることを確認して下さい。

7. ユーザーマニュアルに従い、測定を開始して下さい。測定は全て装置で自動的に行われます。約50分以内に結果が出力されます。
8. 測定終了後、スパーおよび試薬ストリップを装置から取り外して下さい。
9. 使用済みスパーおよび試薬ストリップは、適切な生体有害物質用容器に入れ、各地域の規制に従い廃棄して下さい。

## ■判定

測定完了後、結果はコンピュータで自動的に分析されます。

各検体の蛍光強度は、試薬ストリップの読取りキュベットで2回測定されます。

1回目は、基質にスパーが導入される前の基質用キュベットのバックグラウンド値を測定します。2回目は、スパー内壁に残存する酵素と基質を反応させた後に測定します。

RFV（相対蛍光強度）は、最終結果からバックグラウンド値を差し引いてを算出します。この計算値は結果シートに出力されます。

各検体のRFVはパイダス装置により以下のように算出されます。

$$\text{Test Value (TV)} = \frac{\text{検体のRFV}}{\text{スタンダードのRFV}}$$

閾値および判定基準

閾値 (TV)	判定
< 0.04	陰性 (Negative)
≥ 0.04	陽性 (Positive)

出力される結果内容：

- ・測定項目
- ・検体名
- ・日時
- ・ロット番号およびキットの使用期限
- ・各検体のRFV、Test Value (TV)、判定結果

TVが閾値よりも低値となった場合、サンプルに*E.coli* O157が含まれていないまたは検出限界濃度以下であることを示します。

閾値と同値または閾値よりも高値となった場合は、サンプルが*E.coli* O157で汚染されている可能性を示します。この場合は、“陽性結果の確認”を参照して下さい。

無効結果の報告：

- ・バックグラウンド値が規定値を超えた場合（低レベルの基質汚染の可能性）加熱した培地または使用した試薬（S1、C1またはC2）を用いて再度測定して下さい。
- ・検体測定用ストリップのロット番号に該当するスタンダードがない場合無効となった検体と同一のロット番号のストリップでスタンダードを二重測定し

ます。その後、新たに保管されているスタンダードを用いて試験結果を再計算することができます。詳細はユーザーマニュアルを参照して下さい。

## ■品質管理

陽性コントロールおよび陰性コントロールは、本キットに含まれています。

新しいロットの試薬を使用する前には必ず、これらのコントロールを用いてキャリブレーションを検証して下さい（『キャリブレーション』の項目を参照）。

また、新しいキットを入手した際にも、コントロールを用いて、試薬の性能に変化がないことを確認することを推奨します。

コントロールがC1およびC2で識別されると、装置でコントロール値が確認されます。コントロール値が期待値から外れている場合、結果は有効となりません。

## 注記

品質管理はユーザーの責任の元、各国の規則に従い実施して下さい。

## ■留意事項

操作手順を変更したり、改良したりすると結果に影響を及ぼすことがあります。

## 注記：

本キットによる測定は、H7型を含む *E.coli* O157の存在を警告します。そのため、確認作業はより注意深く実施して下さい。

H7型を含む *E.coli* O157と類似の細胞表面受容体を有するグループ N の *Salmonella* などの菌株が含まれる場合、陽性反応が観察されます (9)。これらの菌株は、確認試験で用いる選択培地で非典型的特徴を示し、本キットの結果と矛盾することが稀に認められます。一方、矛盾する結果として、稀にソルビトール陽性の H7型を含む *E.coli* O157が観察され、本キットでは陽性となるが、確認試験で用いる選択培地で非典型を示します。

$\beta$ -グルクロニダーゼおよびソルビトール反応を原理に用いた選択培地では、通常、*E.coli* O157:H7および O157:H-は、どちらも陰性を示しますが、O157:H-の中に $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性を示すものがあり、また O157:H7においても稀にソルビトール陰性および $\beta$ -グルクロニダーゼ陽性を示すものがあります。何れのタイプも本キットでは陽性と報告されます。

## ●警告

本キットでは、これまでに多くの製品が検査されていますが、様々な食品および製造法があることを考慮し、検査するマトリックスの構成がバイダスECPT法による結果の信頼性に影響しないことを確認することを推奨します。

また、バイダスHeat and Goシステムを用いて、これまでに多くの食品マトリックスが検査されていますが、様々な食品マトリックスおよび製造法があることを考慮し、加熱工程でストリップのサンプルウエル内の検体に凝固や沈殿が発生しないことを検証することを推奨します。凝固や沈殿により、スパーに取り込まれる検体量が不正確になる恐れがあります。

**注記：**卵製品および家禽検体にはバイダスHeat and Go を使用しないで下さい。

## ■性能

下記は、NF VALIDATION の予備試験で得られた結果です。

- ・ 検出率：試験に用いた56株の *E.coli* O157:H7および O157:H-全てが検出されました。
- ・ 相対検出率：50%検出限界は、本キットおよび ISO16654リファレンス法（8）で 0.2-1.6 cells/25 g を示しました。
- ・ 比較試験：371のサンプルが本キットおよび ISO16654リファレンス法（8）で並行して試験したところ：
  - 本キットのみで追加陽性を示したもの：5サンプル
  - 本キットのみで偽陰性を示したもの：5サンプル
  - 一致：361サンプル

以上の結果は、24時間培養後にピオメリュー社製ペプトン緩衝液による培養から得られたものです。

本品は、全ての食品および環境中の生産サンプルの分析の代替法として NF VALIDATION に承認されています。

EN ISO 16654(10)に従って、EN ISO 16654(8)に記載されているリファレンス法と比較して得られたものです。

BIO-12/25-05/09のバリデーション証明書は、AFNOR Certification より入手可能です。NF VALIDATION の有効期限は、証明書に記載されています。



BIO - 12/25-05/09

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

Certified by AFNOR Certification

[www.afnor-validation.org](http://www.afnor-validation.org)

[www.afnor-validation.com](http://www.afnor-validation.com)

本キットは、各種食品中の *E.coli* O157の検出において Performance Tested Method として AOAC Research Institute (Certificate no. 060903) によって有効性が確認および承認されています。



PERFORMANCE TESTED METHOD

Certified by AOAC Research Institute

[www.aoac.org](http://www.aoac.org)

以下の食品群が AOAC バリデーションに含まれます：生牛肉、切落とし牛肉、かんがい用水、生ほうれん草、包装レタス

## ■使用／有効明示

ラベル、添付文書またはユーザーマニュアルによるシステムの使用に伴う性能特性は、完全に確立されたものではありません。それ故、使用者は、添付文書またはユーザーマニュアルによって具体的に説明されている方法以外の使用について、ピオメリュー社は、如何なる要求、表現、許可または保証をしないことに同意および承認するものとします。

ピオメリュー社は、商品適格性、特定使用の適合性を含む明示的または暗黙的な全ての保証について特別に責任を負うことはありません。また、添付文書またはユーザーマニュアルで説明されている方法以外の使用について、直接的、間接的または結果生じる如何なる事態に対して責任を負うことはありません。

ピオメリュー社が提供する製品またはサービスを超越る要求による返済について一切責任を負うことはありません。使用者は、システムの如何なる使用方法およびシステムがその使用方法に適しているかどうかについての判断は、使用者の責任の元有効性を確認することに同意および承認するものとします。

使用者によって有効性が確認された性能とそれに基づくシステムの使用に伴うリスクは、使用者が一切の責任を負うものとします。

## ■廃棄処理

使用済みおよび未使用の試薬の廃棄は、他の汚染した廃棄材料と同様、感染性もしくは感染の危険がある製品の取扱い方法に従って行って下さい。

廃棄物や汚染水については、それぞれの性質または有害性の度合いに応じ、各施設の責任の下、適切な規制に従い、取扱いおよび廃棄処理を行って下さい。

## ■参考文献

1. HOCKIN J., LIOR H. - Hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Canada - *Can. Dis. Weekly Rep.* - Health Welfare Can. - 1987, vol. 13, p. 203-204.
2. PUDDEN D., TUTTLE N., KORN D., et al. - Hemorrhagic colitis in a nursing home-Ontario - *Can. Dis. Weekly Rep.* - 1985, vol. 11, p. 169-170.
3. KNIGHT P. - Hemorrhagic *E. coli* : the danger increases. *ASM news* - 1993, vol. 59, n° 5, p. 247 - 250.
4. FIELDS P.I., BLOM K., HUGUES H.J., et al - Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM - *J. Clinical microbiol.* - 1997, vol. 35, n° 5, p. 1066-1070.
5. CHAHED A., GHAFIR Y., DAUBE G., et al. - Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003 - *Eurosurveillance* - 2005, vol. 10, n°3, p. 33-36
6. AL-SAIGH H., ZWEIFEL C., BLANCO J. et al - Fecal shedding of *Escherichia coli* O157, Salmonella, and Campylobacter in Swiss cattle at slaughter - *Journal of food*



protection® - 1 April 2004, vol. 67, n°4, p. 679 - 684

7. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations* - ISO 7218 - 2007
8. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157* - EN ISO 16654 – 2001
9. De BOER E. and HEUVELINK A.E. – methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* - *Journal of applied microbiology symposium* – 2000, vol. 88, p. 133S-143S.
10. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods* - EN ISO 16140 - 2003.
11. U.S. Department of Agriculture/Food Safety Inspection Services - *Microbiological Laboratory Guidelines* -  
[http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological\\_Lab\\_Guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp).
12. *Bacteriological Analytical Manual* - U.S. Food and Drug Administration -  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>

※※記号

記号	内容
	品番
	製造元
	保管温度
	使用期限
	ロット番号
	添付文書を参照
	<n>回分の試験を含む
	製造日

**【問い合わせ先】**

シスメックス株式会社

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階  
TEL 0120-022-328

シスメックス・ピオメリュー株式会社

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階  
TEL 03-6834-2666 (代表)

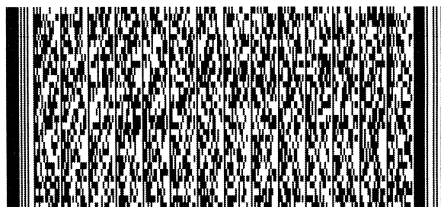
**【製造販売業者の氏名または名称及び住所】**

シスメックス・ピオメリュー株式会社

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階

# PTC プロトコルデータ

1



製造販売元 シスメックス・ビオメリュー株式会社

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階

