

バイダス UP アッセイキット リステリア(LPT)

VIDAS UP Listeria (LPT)

品番 **30126**

ファージ由来の遺伝子組み換えタンパク質を利用したバイダス UP アッセイキット リステリアは、自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダスで食品のほか、製造環境サンプルに存在するリステリアを自動で検出するためのキットです。

現在のリステリア属の分類では、無芽胞形成、短桿状、運動性、グラム陽性桿菌の6つの種が含まれます。これらの細菌はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、エスクリン加水分解能、ガス非産生のグルコース発酵能を有します。これらの細菌は、幅広い温度とpH値で生育することができ、高濃度の塩化ナトリウムに耐性があります(1, 2)。リステリア属の一部は偏在し、ある種には病原性があります。リステリアは、日常食品、肉、野菜、海産等を含む様々な食品や環境検体（特に食品加工工場）から分離されます。人にとってリステリア症は、髄膜炎、敗血症、脳炎、流産の原因となり得ます。最大のリスクをもつ集団は、妊婦や新生児、免疫不全患者、高齢者です(3)。従来のリステリア属の検出方法では、操作が複雑で手間のかかる増菌手順を伴い、さらに最終結果を得るまでに長時間の培養を要します(4, 5)。

■原理

バイダス UP アッセイキット リステリアは、酵素免疫蛍光測定法（ELFA法）により自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダスでリステリア抗原を検出するための酵素免疫測定用のキットです（ユーザーズマニュアルを参照）。

固相容器（スパー）は固相のほかピペット器具として利用します。スパー内壁はリステリア抗原による特殊なタンパク質でコーティングされています。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。

装置によってすべ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。リステリア抗原が存在すると、スパー内壁にコーティングされているリステリア抗原に特異性のあるタンパク質に結合します。未結合の成分は洗浄段階で排除されます。アルカリフォスファターゼ標識タンパク質がスパー内を循環し、スパー内壁に結合しているリステリア抗原と結合します。

最終の洗浄段階で未結合の標識タンパク質が除去され、最終検出段階では基質（4-

メチル-ウンベリフェリリン酸）がスパー内を循環し、標識酵素がこの基質の加水分解を触媒して、蛍光産物（4-メチル-ウンベリフェロン）が生成されます。この蛍光を450nmで測定します。

分析終了時には自動的に結果が解析され、各試料の測定値（TV）が算出されます。この数値を内部標準（閾値）と比較して、結果を判定します（陽性、陰性）。

■キット構成（60テスト）

LPT試薬ストリップ (60本)	STR	調製済み
LPTスパー (60本)	SPR	調製済み スパー内壁はリステリア抗原による特異的なタンパク質でコーティングされています。
LPTスタンダード (6 mL×1本)	S1	調製済み 不活化精製リステリア抗原+防腐剤+タンパク質安定剤 信頼区間はMLEカードに以下の文言の後に記載されています。 「スタンダード(S1)相対蛍光強度の範囲」
LPT陽性コントロール (6 mL×1本)	C1	調製済み 不活化精製リステリア抗原+防腐剤+タンパク質安定剤 信頼区間はMLEカードに以下の文言の後に記載されています。 「コントロールC1(+)検査値の範囲」
陰性コントロール (6 mL×1本)	C2	調製済み TRIS緩衝食塩液 (TBS) (150mmol/L) -Tween pH7.6+ 防腐剤 検査の最大許容値はMLEカードに以下の文言の後に記載されています。 「コントロールC2(-)検査値の範囲」
MLEカード（マスター ロットデータ入力） (1枚)		キャリブレーションに必要な工場用マスターキャリブレーションデータの仕様：MLEデータを読むにはユーザーズマニュアルを参照して下さい。

●スパー

製造工程でスパー内壁にリステリア抗原に特異的なタンパク質がコーティングされます。

各スパーは「LPT」コードで識別されます。パッケージから必要な本数のスパーを取り、開封後はパッケージをしっかりと密閉して下さい。

●試薬ストリップ

各ストリップは10個のウエルを有しています。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。ラベルには主にアッセイコード、キットのロット番号および有効期限を示すバーコードが記載されています。1番目のウエルには試料を導入しやすいように穴が開いています。各ストリップの最後のウエルは蛍

光値の読み取りが行われるキュベットです。ストリップの中央にあるウエルにはアッセイに必要な各種試薬が含まれています。

● LPT試薬ストリップの構成内容

ウエル	試薬
1	サンプル用ウエル：増菌培地、スタンダードまたはコントロールの500 μ Lを分注
2	予洗液（400 μ L）：TRIS-NaCl（150mmol/L）-Tween pH7.6+防腐剤
3-4-5-7-8-9	洗浄液（600 μ L）：TRIS-NaCl（150mmol/L）-Tween pH7.6+防腐剤
6	標識抗体（400 μ L）：アルカリフォスファターゼ標識リステリア抗原による特殊なタンパク質+防腐剤
10	蛍光基質（300 μ L）を含有する判定用キュベット：4-メチル-ウンベリフェリルリン酸（0.6mmol/L）+ジエタノールアミン*（DEA）（0.62mol/Lまたは6.6%、pH9.2）+防腐剤

*刺激性試薬：

- R36：眼刺激性

- S26：眼に入った場合は、直ちに多量の水で洗い流し、医学的助言を求めて下さい。
安全情報の詳細については、お問い合わせ下さい。

■ 必要な試薬、材料および消耗品

- ・自動免疫蛍光測定装置バイダスまたはミニバイダス
- ・ディスプレイブルーピペット
- ・バイダスHeat and Go（品番93554または93555または93556：シスメックス・ピオメリユー株式会社担当者にご連絡下さい）もしくはウォーターバス（95-100℃）またはそれと同等なもの
- ・ストマッカーミキサー
- ・フィルター付きストマッカーバッグ
- ・LPT培地（10mL入り：品番410845、100mL入り：品番410846、225mL入り：品番410848）

指針として以下の標準品があります。

- ・バルカム寒天培地（品番43559）
- ・オックスフォード寒天培地（品番43560）
- ・Ottaviani基調のリステリア寒天培地

例

- ALOA培地（品番 AEB520079またはAEB520080）
- アビ リステリア（品番10300）

その他の特別な材料および消耗品については装置のユーザーズ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。
- ・バイダスまたはミニバイダスは微生物分析用の部屋に設置して下さい。
- ・医薬品の安全性に関する非臨床試験実施基準（GLP）（例、ISO7218の標準法）を遵守して下さい(3)。
- ・本製品に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）。
- ・パッケージに穴があいているスパーは使用しないで下さい。
- ・劣化が見られるストリップ（ホイルまたはプラスチックの破損）は使用しないで下さい。
- ・ラベルに記載された有効期限を過ぎている試薬は使用しないで下さい。
- ・異なるロットの構成試薬（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合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排水する場合は、金属アジ化合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。上述した危険性を示す「R」および使用上の注意を示す「S」を参照して下さい。
- ・こぼれた場合は液体洗剤または少なくとも0.5%次亜塩素酸ナトリウムを含有する家庭用漂白液を付けてきれいに拭き取って下さい。装置の上部または内部の飛び散りを拭き取る場合はユーザーズ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で滅菌しないで下さい。
- ・装置は定期的に清浄し、汚染を除去して下さい（ユーザーズマニュアルを参照）。

■貯蔵条件

- ・キットは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。
- ・キットを開封した時に、スパーのパッケージが正しく密封されており、破損がないことを確認して下さい。もし、密封されていなかったり、破損していた場合は使用しないで下さい。
- ・使用後はスパーの安定性を保つために、乾燥剤が入ったパッケージをしっかりと密閉し、キット全品を2－8℃に戻して下さい。
- ・推奨される条件で保管すれば、すべての構成部品はラベルに記載されている有効期限まで安定しています。

■試料調製

以下のプロトコルを推奨します。
使用前に増菌培地を室温（18－25℃）に戻します。
冷凍されたサンプルは、事前に解凍して下さい。

ISO承認法（NF承認法）（BIO-12/33－05/12）

食品および製造環境サンプルに対する標準的な方法

- ・フィルター付きストマッカーバッグに以下を無菌的に入れます。
 - 試料X g（X mL）
 - 9倍量のLPT培地

注意1：環境サンプルについては、始めに適切な中和剤（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（ペプトン緩衝溶液）で採取器具を湿らせて下さい。試料採取後、サブリメントを添加した適量のLPT培地に器具を入れて下さい（スワブには10mL、サンプリングパッドは100mL）。

注意2：NF承認法では、25gを超える量の試料は検査しないで下さい。

- ・ストマッカーミキサーで混合します。
- ・30±1℃で26－30時間培養します。

注意：拭き取り検体は30±1℃で22－30時間培養して下さい。
- ・培養後、ストマッカーバッグ内容物をホモジナイズします。

バイダスHeat and Goを使用する場合、ストリップ上のサンプル用ウエルに増菌培地0.5mLを移します。5±1分間加熱します（バイダスHeat and Goのユーザーズマニュアルを参照）。ストリップを取り出し、10分間放冷します。

注意：卵製品および家禽サンプルにはバイダス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は増菌培養液2－3mLを試験管に移します。試験管を密閉し、95－100℃で5±1分間加熱します。試験管を冷却します。煮沸した培地を混合し、バイダスストリップ上のサンプル用ウエルに0.5mLを移します。
- ・バイダスまたはミニバイダスで測定します。

注意：加熱していない増菌培養液は、バイダスまたはミニバイダスで試験を行う

前に2－8℃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。

注意：陽性の結果が確認され、速やか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。確認試験は、培養後72時間以内に開始して下さい。

NF承認法による陽性結果の確認試験

NF承認法では、バイダス UP アッセイキット リステリアで陽性結果となった場合は確認試験を実施して下さい。

- ・バルカム寒天培地、オックスフォード寒天培地またはリステリアの検出法としてNF VALIDATIONにより認められている酵素基質培地で分離します。
- ・添付文書の使用方法に従って培地を培養します。その後、次の方法の中から一つの方法を用いて実施します：
 1. CENまたはISO（精製段階を含む）の標準法に記載される従来の方法を利用し、1－5個の特徴的コロニーを同定します(7)。
 2. 典型的*Listeria*のコロニーが認められた場合、*Listeria*の存在を確認する必要があります。
 3. ビオメリュー社のアピ リステリアを用いて単離されたコロニーを同定します。選択培地で生育したコロニーを直接用いることが可能です。矛盾する結果が出た場合は（代替法で陽性かつ上述した方法で陰性の場合）、得られた結果が有効であることを確認するために必要な手順を取らなければなりません。

例えば以下の追加の方法の実施をお勧めします。

- ・LPT培地10mLに加熱していない増菌培養液1mLを移します。
- ・30±1℃で22－26時間培養後、選択分離培地で分離します。
- ・CENまたはISO（精製段階を含む）の標準法に記載される従来の方法を利用し、1－5個の特徴的コロニーを同定します(7)。

注意：ALOA培地などに成育した定形コロニーを用いての*Listeria monocytogenes*の確認試験は、各培地で検証済みの試験操作に従い実施することが可能です。各培地の使用説明書に従って試験して下さい。

■使用方法

詳細な使用方法についてはユーザーズマニュアルを参照して下さい。

●バイダスPTCプロトコルデータの入力

本アッセイキットを初めて分析に使用する場合、MLEデータの読み取り前に装置の外部バーコードリーダーを利用してバーコード（添付文書の最後に記載）をスキャンします。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。アッセイキットを初めて使用する場合にのみこれらのデータの読み取りを行います。

● マスターロットデータの入力

注意：本アッセイキットを初めて使用する場合、MLEデータの読み取り前にバイダスPTCプロトコール（添付文書の最後にあるバーコード）を入力して下さい。バイダスPTCプロトコールの入力前に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。

新しいロットを使用する場合は常に、MLEデータを利用して装置に仕様（または工場のマスターキャリブレーションカーブデータ）を入力しなければなりません。検査を開始する前にこの操作を実施しないと結果を印刷することができません。各ロットにつきマスターロットデータを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用手または自動で入力します（ユーザーズマニュアルを参照）。

● キャリブレーション

新しいロットを開ける場合は常に、マスターロットデータを入力してからキットに含まれるスタンダードを利用してキャリブレーションを実施しなければなりません。その後は28日間に1回、キャリブレーションを実施します。この操作によって、装置特有のキャリブレーション情報が得られ、キットの有効期間内でアッセイ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（ユーザーズマニュアルを参照）。スタンダードの数値は規定のRFV「相対蛍光強度」の範囲内でなければなりません。範囲内に入らない場合は再度、キャリブレーションを実施して下さい。

● 操作方法

1. 冷蔵庫から必要な試薬のみを取り出して下さい。少なくとも30分以上常温で放置して下さい。
2. 試験する各試料、コントロールまたはスタンダードにLPTストリップ1本およびLPT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閉して下さい。
3. 検査は装置上の「LPT」コードで識別されます。スタンダードは「S1」として識別し、二重測定します。
陽性コントロールを検査する場合は「C1」として識別します。
陰性コントロールを検査する場合は「C2」として識別します。
4. 必要に応じて、ボルテックスミキサーでスタンダードおよびコントロールを混合し、サンプル用ウエルに500 μ Lを分注します。
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. 加熱と試料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. スパーおよびストリップを装置に挿入します。スパーおよび試薬ストリップ上のアッセイコードとカラーラベルが一致することを確認して下さい。
7. ユーザーズマニュアルの指示どおりに分析を開始します。分析は装置によって最後まで自動で行われます。約62分以内に結果が出ます。

8. 分析終了後、スパーおよびストリップを装置から取り出します。

9. 使用済みスパーおよびストリップは現地の関連規則に準じて、適切な生体有害物質用容器に廃棄して下さい。

■ 判定

分析が終了した時点で、コンピュータが結果を自動的に分析します。

各試料の試薬ストリップの読み取りキュベットで蛍光強度を2回測定します。

1回目の測定値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です。2回目の測定は基質がスパー内壁に残る酵素と共に培養されてから行われます。

最終結果からバックグラウンド値を差し引いてRFV（相対蛍光強度）を算出します。この計算値が結果のシートに印刷されます。

以下のようにバイダスまたはミニバイダスによって各試料のRFVが判定されます。

$$\text{測定値 (TV)} = \frac{\text{試料のRFV}}{\text{スタンダードのRFV}}$$

閾値および判定

測定値の閾値	判定
<0.05	陰性
≥0.05	陽性

印刷された報告書には以下が含まれます。

- ・実行した検査の種類
- ・試料の識別
- ・日時
- ・キットのロット番号および有効期限
- ・各試料のRFV、測定値（TV）および判定結果

測定値（TV）が閾値より小さい場合は、その試料にリステリア抗原が含まれない、または含まれたとしても検出限界以下の濃度であることを示しています。

測定値（TV）が閾値以上の場合、試料がリステリアで汚染されていることを示しています。この場合は対応するセクション「陽性結果の確認試験」を参照して下さい。

無効な結果は報告されます。

- ・バックグラウンド値があらかじめ定義されたカットオフ値を上回る場合（基質の低レベル汚染を示します）。

この場合は加熱した培地または使用した試薬 (S1、C1またはC2) を用いて再度分析して下さい。

- ・ サンプル検査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。
この場合は、無効となった検査と同じ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検査結果を再計算することができます。詳細についてはバイダスのユーザーズマニュアルを参照して下さい。

■精度管理

各バイダス UP アッセイキット リステリアには陽性コントロールおよび陰性コントロールが含まれています。

新しい試薬のロットを入手するたびにこれらのコントロールを用いて精度管理を実施します (セクション「キャリブレーション」を参照)。

新しいキットを入手した時には精度管理を実施し、試薬の性能が変化していないことを確認して下さい。

装置はコントロールがC1およびC2と識別されている場合にその数値を確認できるようになっています。

コントロールの数値が予測値を逸脱している場合は結果を有効とすることはできません。

注意

ユーザーは現地の関連する規則に従って精度管理を行う責任があります。

留意事項

操作方法を変更したり、改良したりすると結果に影響を及ぼすことがあります。

警告

これまでバイダス UP アッセイキット リステリアによって多くの製品が検査されています。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 UP アッセイキット リステリアの結果の信頼性に影響しないことを確認されるようお勧めします。

これまでバイダス Heat and Go システムによって多くの食品マトリックスが評価されています。本システムを作動させる場合は、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、加熱工程によってバイダスストリップのサンプル用ウエル中の試料が凝固したり沈殿したりしないよう検証されることをお勧めします。試料が凝固したり沈殿したりすると、スパーに取り込まれる試料の量が不正確となる場合があります。

バイダス UP アッセイキット リステリアは、食品および製造環境サンプルの分析に関する代替法としてNF VALIDATIONで承認されています。本承認は、EN ISO 16140 (8)に従い、EN ISO 11290-1/A1 (7)で記載されている方法と比較して得られました。BIO-12/33-05/12 証明は、Technical Assistance 又はAFNOR 承認から得られます。NF VALIDATION の有効期限は、証明書に記載されています。



BIO-12/33-05/12

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

Certified by AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

www.afnor-validation.com

■性能

評価にはピオメリュー社の培地が用いられました。

■使用/有効明示

ラベル、添付文書または操作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、添付文書または操作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、添付文書または操作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す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り扱い方法に従って行って下さい。

廃棄産物や流出物は各検査室の責任の下、それぞれの危害毒性や度合いを考慮し、適切な規則に従って処理し、廃棄して下さい。

■参考文献

1. SEELIGER H.P.R. and D. JONES - Genus *Listeria* - In SNEATH P., MAIR N., Sharpe M.E., HOLTS J. - *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* – Ed. Williams and Wilkins / Baltimore, MD., 1986 - vol. 2, p. 1235-1245.
2. ROCOURT J., BOERLIN P., GRIMONT F., et al. - *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992 – vol. 42, p. 69-73.
3. BILLE J. and DOYLE M. - *Listeria and Erysipelothrix* - In BALOWS A., HAUSLER W. Jr., HERRMANN K., ISENBERG H., SHADOMY H.J. - *Manual of Clinical Microbiology 5th ed.* Ed. American Society for Microbiology / Washington, D.C., 1991 – p. 287-292.
4. LOVETT J. - *Listeria* Isolation - Supplement to FDA Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. - Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA., 1987, revised 1988, 1990 - Ch. 29.
5. COOK V. - *Microbiology Laboratory Guide Book, 3rd ed.* – Ed. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Services. - Washington D.C., 1999 (Revision 2 ; 11/08/99) - Isolation and Identification of *L. monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples.
6. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations* - ISO 7218 – 2007
7. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method* – EN ISO 11290- 1 and EN ISO 11290-1/A1
8. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods* – EN ISO 16140 – 2003

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

【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)

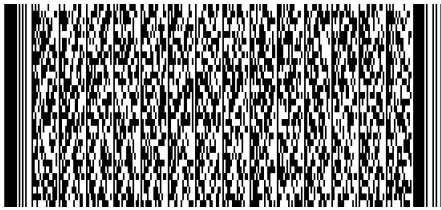
【製造販売業者の氏名または名称および住所】

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プロトコールデータ

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

