この説明書をよく読んでから使用して下さい

研究用試薬

2013 年 8 月作成（第 1 版）

Etest® フォームパック

P711

【はじめに】

- 本品は細菌の薬剤感受性及び体制のメカニズムを検出する試薬です。
- 説明書以外の使用方法については保証致しません。

【形状・構造等（キットの構成）】

本品は、ストリップ（固体）に正確な濃度の薬剤を含有させて乾燥処理したものです。薬剤の種類は各ストリップに印刷された記号で表示されています。

【使用目的】

細菌の抗菌薬または酵母様真菌の抗真菌薬に対する感受性の測定

【測定原理】

被検菌を接種した培地上にストリップを配置し、培養後の阻止円と本品の目盛が交差した点を判読して、MIC値を判定します。
本品は、記号により示された薬剤等をプラスチックのストリップに固定し、対応するMIC値をμg/mLで表記してあります。ESBL(Extended Spectrum Beta Lactamase) 及びMBL (Metallo Beta Lactamase) 等、耐性検出用には、薬剤等を2方向に塗布してあります。本品を菌液接種された培地表面に配置すると、薬剤等の濃度勾配は、直ちに培地に移行します。濃度勾配はストリップに沿ってできあがり、各種微生物の発育期間中、安定的に維持されます。一昼夜又はそれ以上のインキュベーションの後、左右対称の阻止円がストリップに沿って出来上がり、それらのパターンより、耐性のメカニズム等が確認できます。

【操作上の注意】

1. 各施設毎に必ず、CLSI®に従って、定期的に精度管理を実施して下さい。
2. 精度管理結果が規格外であるとき、測定結果を報告しないで下さい。
3. 本品を用いた検査は、微生物試験従事者が行って下さい。

【用法・用量（操作方法）】

＜測定前準備＞

本品はそのまま使用します。冷蔵又は冷凍保存の製品は、使用前に室温に戻します。（+4℃保存の場合 15 分程度、-20℃保存の場合 30 分程度）
パッケージ表面の水分が完全に蒸発している事をご確認下さい。
はさみを使用して注意深くアルミニウムパッケージの端を切ってください。必要な本数のみを取出し、残りは適切な保管条件で保管して下さい。
注）一度室温に戻した製品はすぐにご使用下さい。
注）MIC 値の目盛の裏面部分には薬剤が含まれておりますので、触れないようにして下さい。

＜必要な器具・器材・材料等＞

培地（感受性試験に適切なもの）、菌液調製用懸濁培地、マクファーランドスタンダード0.5及び1（品番70900）又はデンシマット（品番99234）、インキュベーター（35±2℃）（嫌気ジャー又はチャンバー、CO2 チャンバー）、シャーレ（90㎜又は150㎜）、滅菌済みエーゼ、滅菌綿棒、試験管、ピペット、はさみ、ピンセット又はMini Grip It (品番411200)、フォームクリップ（品番559809）、除湿剤（Etest 除湿剤 品番559709）、密封容器（Etest 保管容器 ミニ 品番559900、Etest 保管容器 品番559901、Etest 保管容器 ラージ 品番559902）、精度管理用菌株
Etest製品関連資料：「Etest 性能・判定基準・精度管理基準一覧」、「Etest 試験条件一覧」、「Etest 判定写真例 細菌」、「Etest 判定写真例 真菌」(http://products.sysmex-biomerieux.net/clinical/c015.phpよりダウンロードして下さい。)

＜測定（操作）法＞

推奨培地や培養方法についての詳細は「Etest 試験条件一覧」を参照して下さい。（http://products.sysmex-biomerieux.net/clinical/c015.phpよりダウンロードして下さい。）

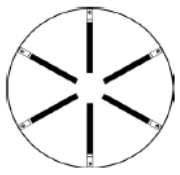
培地：被検菌により適切な培地及び添加剤を選んで下さい。培地の厚さは4.0±0.5mm、pH7.3±0.1の適切な品質のものを選んで下さい。使用する培地は正確で信頼性の高いMIC値が得られる、ロット間の再現性が担保されたものを選んで下さい。

菌液の調製：適切な培地で終夜培養後、よく分離されたコロニーを採取します。適切な懸濁培地を用いて、マクファーランドスタンダードと比較して濁度を確認し、菌液を調製して下さい。栄養要求の厳しい菌は、15分以内に菌液調製と接種を終えて下さい。

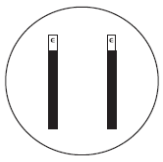
菌液の接種：滅菌綿棒等を菌液に浸し、試験管の内壁に押し付けて過剰な水分を除去して下さい。注意深く培地表面全体に、シャーレを60度ずつ回転させながら、むらなく3回塗布して下さい。被検菌が真菌の場合、**この手順を2度繰り返して下さい。**本品を配置する前に、培地表面が乾いた状態にして下さい。
注）特に 90mm シャーレをご使用の際は過剰な水分を十分に除去して下さい。阻止円が歪んだり、MIC 判読が困難になることがあります。

ストリップの配置：ピンセット又はMini Grip It（品番411200）（図1）を用いて取り出したストリップを、MIC値の目盛が表示されている部分が表側になるように等間隔に配置して下さい。一度配置したら動かさないで下さい。3～6本のストリップを配置する場合は150㎜シャーレ（図２）、1～2本のストリップを配置する場合は90㎜シャーレ（図３）をご使用下さい。
注）ストリップと培地表面に隙間のないように配置し、隙間ができた場合には上からストリップを軽く押して下さい。
注）耐性度が低いと予想される菌種に関しては、150㎜シャーレに少ない本数を配置するか又は90㎜シャーレにストリップ1本を配置して下さい。
注）Etestは無孔のプラスチックストリップである為、裏返しでストリップを配置すると薬剤が拡散せず、阻止円が正しく形成されません。

(図１)
Mini Grip It 使用例



（図２）
３～６本の場合、
150㎜ シャーレ使用



（図３）
１～２本の場合、
90㎜ シャーレ使用

培養：被検菌ごとに最適な条件で倒置培養して下さい。
注）シャーレは5段以上積まないで下さい。

【測定結果の判定法】

結果の判定：必要な培養時間後、均一な発育が明瞭に見られた場合にのみ、阻止円がストリップを横切る位置でMIC値を判定します。判定の詳細は、http://products.sysmex-biomerieux.net/clinical/c015.php「Etest 性能･判定基準･精度管理基準一覧」、「Etest 判定写真例 細菌」及び「Etest 判定写真例 真菌」を参照して下さい。
MIC値に基づくカテゴリーの判定は、CLSI等の勧告を参照して下さい。MIC値が目盛と目盛の間にある場合は、高濃度側の目盛をMIC値として下さい。カテゴリー判定をする場合には、2倍希釈系列の高濃度側のMIC値を用います。
注）複数の菌が発育している場合や、菌の発育が多すぎたり少なすぎたりする場合、MIC値の判別が困難な場合は、再試験を行って下さい。

【結果の解釈】

耐性検出用ストリップのうち、ESBL、MBL、AmpCについては、薬剤単独でのMIC値が薬剤＋阻害剤でのMIC値よりも8倍以上高い場合、あるいはディフォーメーションやファントムゾーンが確認された場合、ESBL、MBL、AmpCとそれぞれ判定されます。GRDについては、VAあるいはTPのMIC値が8以上であった場合GRDと判定されます。VISAかhVISAかを判定するには、通常のEtest バンコマイシン VA（品番：412488(30枚)、525518(100枚)）を用いてMIC値を測定して下さい。バンコマイシンのMIC値が4以上の場合はVISA、4より小さい場合はhVISAと判定されます。
なお、耐性検出用ストリップで読取ったMIC値は報告には用いず、必ず通常の薬剤感受性試験用Etestをご使用下さい。

【精度管理】

精度管理は、＜測定（操作）法＞に従い、適当な精度管理株を用いて実施して下さい。測定したMIC値が「Etest 性能・判定基準・精度管理基準一覧」に記載の範囲内であった場合、精度管理を合格したと判断して下さい。

精度管理範囲は、CLSIで定義されたものと異なる薬剤もあります。Etestの精度管理範囲は、複数年に渡り、複数施設で実施した多くのロットを用いた試験に基づいています。得られた結果が精度管理範囲内であるか否かを判断するには、【測定結果の判定法】に基づき、2倍希釈系列でのMIC値を用いて下さい。

マクファーランドスタンダードは正確な生菌数を保証するものではありません。定期的にコロニー数をカウントするようにして下さい。

【使用上又は取扱い上の注意】

(1) 使用期限を過ぎた製品は、使用しないで下さい。
(2) 使用する前に、各試験用試薬及び包装に破損がないことを確認して下さい。破損がある場合は使用しないで下さい。
(3) 試験が適切に行われていることを確認するために、CLSI等の勧告に従った精度管理用菌株を使用して下さい。精度管理用菌株の試験成績の概要はhttp://products.sysmex-biomerieux.net/clinical/c015.php「Etest 性能･判定基準･精度管理基準一覧」を参照して下さい。
(4) 本品を使用する前に、この説明書をよく読んで使用して下さい。この説明書に記載されていない方法で使用した場合、本品に改造等を加えた場合は、測定結果の保証ができません。
(5) 患者から採取した検体の取扱いには、充分注意し、廃棄する際は必ずオートクレーブで滅菌する等、適切に処理して下さい。

(6) 使用済みの検体、試薬、器具等は必ずオートクレーブで滅菌、焼却又は消毒液､塩素酸ナトリウム溶液で処理したものはオートクレーブで滅菌しないで下さい。

(7) ミューラー・ヒントン寒天培地中の陽イオン含有量は、培地取り扱いメーカーやロットによって異っている可能性があり、試験結果に影響をおよぼす可能性があります。使用する際は、ロット毎に精度管理試験を行って下さい。

(8) 発育条件の厳しい菌を5%CO2環境下で培養する場合は、pH値の低下が抗菌薬の抗菌活性に影響を及ぼします。好気培養時と嫌気培養時の結果の違いに注意して下さい。

(9) 特に耐性発現が遅い菌、発育が遅い菌、及び発育条件が厳しい菌を試験する場合は、結果判定の前に、推奨培養時間で適切に培養されているか確認して下さい。

(10) バイテック２ 0.45%滅菌食塩水（1000mL）（品番17564）、シェドラーブイヨン（ビタミンK3添加）（品番42098）、ブレインハートインフュージョンブイヨン（品番42081）はEtestを用いた試験に使用することができます。

【廃棄処理】

未使用の試薬は、非感染性の廃棄物として通常の方法で廃棄して下さい。
使用済みの試薬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のある製品の取り扱い方法に従って廃棄して下さい。
起こりうる危険を適切に考慮の上、各検査室の責任の元、廃棄産物や流出物はそれぞれの危害毒性や度合いを考慮し、地域の適切な規制に従って廃棄して下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

本品は、パッケージに記載の保管条件で、使用期限まで使用できます。
開封後は、乾燥を保ち、開封口をフォームクリップ等でしっかりと密閉するか又は密封容器で付属の乾燥剤と一緒に保管して下さい。
保管に際し、水分、熱及び直射日光を避けて保管して下さい。

使用期限は、パッケージの ⌛ マークを参照して下さい。
保管温度は、パッケージ貼付のラベルの色調で判別して下さい。
ピンク色：－20℃～＋22℃
水色：－20℃～＋8℃

【包装単位】

100 枚入

【主要文献】

1.Bolmström, A. et al. (1988). A Novel Technique for Direct Quantification of Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms. ICAAC, poster 1209.
2.Baker, C. N. et al. (1991). Comparison of the Etest to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. Journal of Clinical Microbiology.
3.Brown, D. F. J. and Brown, L. (1991). Evaluation of the Etest, a novel method of quantifying antimicrobial activity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
4.Jorgensen, J. H. et al. (1994). Detection of penicillin and extended spectrum cephalosporin resistance among S. pneumoniae clinical isolates using Etest. Journal of Clinical Microbiology
5.Citron D. M. et al. (1991). Evaluation of Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Journal of Clinical Microbiology .
6.Sanchez M. et al. (1993). Etest, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiological application. The Antimicrobic Newsletter.
7.Schulz J. E. et al. (1993). Reliability of the Etest for detection of ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in Enterococcus spp. Journal of Clinical Microbiology.
8.Baker C. N. et al. (1994). Optimizing testing of methicillin resistant Staphylococcus spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.
9.Tenover F. C. et al. (1996). Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of S. pneumoniae. Journal of Clinical Microbiology.
10.Rosenblatt J. E. et al. (1995). Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.
11.Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; Guidance for Industry and FDA. August 2009.
12.Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine. 5th Ed. 2005. Williams & Wilkins, USA.
13.Murray, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 9th Ed. 2001. ASM Press.
14.CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard, M7-A (latest edition).
15.CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests of Anaerobic Bacteria. Approved Standard, M11-A (latest edition).
16.CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S (latest edition).
17. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI M27-A (latest version).
18. Pfaller M.A., Messer S.A., Bolmström A., Odds F.C., Rex J.H. (1996). Multisite reproducibility of the Etest method for Antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* (*JCM*). **34**(7):1691-1693.
19. Espinel-Ingroff A., Pfaller M.A., Erwin M.E., Jones R.N. (1996). Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. *JCM*. **34**(4): 848-852.
20. Pfaller M.A., Messer S.A., Karlsson Ä., Bolmström A. (1998). Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *JCM*. **36**(9):2586-2589.
21. Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A., Jones R.N. (2000). Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. *JCM*. **38**(10): 3715-3717.
22. Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A., Jones RN. (2001). Evaluation of the Etest method for determining posaconazole MICs for 314 clinical isolates of *Candida* species. *JCM*. **39**(11): 3952-3954.
23. Barry A.L., Pfaller M.A., Rennie R.P., Fuchs P.C., Brown S.D. (2002). Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (AAC). **46**(6): 1781-1784.
24. Maxwell M.J., Messer S.A., Hollis R.J., Boyken L., Tendolkar S., Diekema D.J., Pfaller M.A, and the International Fungal Surveillance Participant Group. (2003). Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *JCM*. **41**(3): 1087-1090.
25. Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R.J. (2003). Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion and Etest methods: Report from Artemis global antifungal susceptibility program 2001. *JCM*. **41**(4): 1440-1446.
26. Pfaller M.A., Diekema D.J., Boyken L., Messer S.A., Tendolkar S., Hollis R.J. (2003). Evaluation of Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *C. glabrata* to fluconazole and voriconazole. *JCM*. **41**(5): 1875-1880.
27. 河喜多龍祥「薬剤感受性検査」 近代出版

【問い合わせ先】

シスメックス株式会社　CS センター
〒651-2241　神戸市西区室谷 1 丁目 3 番地の 2
TEL 0120（265）034

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
TEL 03（6834）2666（代表）

【造販売業者の氏名または名称及び住所】

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

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

9305056D-en-2013/02