

この説明書をよく読んでから使用してください。

研究用試薬

2015年03月 作成(第1版)

MIZUHO MEDY Co., Ltd.

IMP (βラクタム薬耐性因子) 及び AAC(6')-Iae、  
AAC(6')-Ib (アミノグリコシド薬耐性因子) 同時検出

## クイックチェイサー®IMP/AAC 研究用

### 【はじめに】

近年、抗生物質を中心とした各種抗菌薬の発達により、細菌等の感染症による死亡率は著しく減少した反面、各種抗菌薬の大量使用に伴う薬剤耐性菌の出現が問題となっています。

日常検査で検出される腸内細菌や緑膿菌やアシネトバクター等のグラム陰性桿菌に認められるβ-ラクタム系薬剤耐性因子としてβ-ラクタマーゼ、アミノグリコシド系薬剤耐性因子としてアミノグリコシド修飾酵素があります。β-ラクタマーゼはβ-ラクタム系薬剤を加水分解することで不活化し、アミノグリコシド修飾酵素はアミノグリコシドをアセチル化やリン酸化など修飾することで不活化します。これらの耐性因子の多くはプラスミドによって伝播され、菌同士の接触により耐性因子が伝達されることで菌が耐性を獲得するとされています。さらには、菌株や菌種も超えて伝達されることで、耐性菌が広範囲に劇的に増殖しやすく、施設内や環境内にも拡散・伝播しやすいため細心の注意が必要とされています。そのため、感染防止対策において迅速な検出が求められています。

「クイックチェイサー®IMP/AAC 研究用」はイムノクロマト法の原理に基づき、菌体(コロニー)のβ-ラクタマーゼの1種であるIMP型メタロ-β-ラクタマーゼ(以下IMP)及びアミノグリコシド修飾酵素に分類されるAAC(6')-Iae(以下Iae)、AAC(6')-Ib(以下Ib)を簡便なステップで迅速かつ特異的に検出する研究用試薬です。

### 【全般的な注意】

- 1)本品は研究用試薬であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。
- 2)本品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着したり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下さい。

### 【試薬の構成および成分】

- 1)テストプレート
  - ・ラットモノクローナル抗IMP抗体
  - ・ラットモノクローナル抗IMP抗体結合金コロイド
  - ・ラットモノクローナル抗Iae抗体
  - ・ラットモノクローナル抗Iae抗体結合金コロイド
  - ・ラットモノクローナル抗Ib抗体
  - ・ラットモノクローナル抗Ib抗体結合金コロイド
- 2)抽出液
  - ・0.09% - アジ化ナトリウムを含む緩衝液

### 【測定原理】

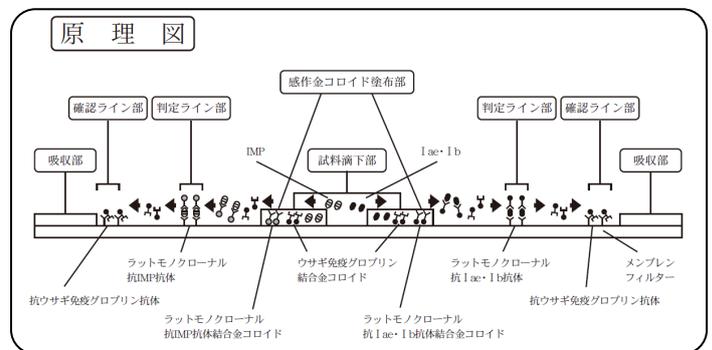
「クイックチェイサー®IMP/AAC 研究用」はイムノクロマト法(Immunochromatographic Assay)の原理に基づいたIMP及びIae、Ibを検出する研究用試薬です。

テストプレート内にセットされているメンブレンフィルター上の感作金コロイド塗布部にはラットモノクローナル抗IMP抗体結合金コロイドと確認ライン用のウサギ免疫グロブリン結合金コロイドが塗布されています。また、メンブレンフィルター上の判定ライン部にはラットモノクローナル抗IMP抗体が固相化され、確認ライン部には確認ライン用の抗ウサギ免疫グロブリン抗体が固相化されています。

試料中にIMPが存在する場合、イムノクロマト法の原理により、試料滴下部から移動してきた試料中のIMPはラットモノクローナル抗IMP抗体結合金コロイドと反応し、さらにラットモノクローナル抗IMP抗体と反応することで、判定ライン部に捕捉されます。その結果、判定ライン部に金コロイドによる赤紫色のラインが出現します。

また同時にウサギ免疫グロブリン結合金コロイドも移動して確認ライン部上の抗ウサギ免疫グロブリン抗体に捕捉されるため、IMPの有無に関わらず赤紫色のラインが出現します。

AAC(Iae・Ib)もIMPと同様の原理でラインが出現します。



### 【操作上の注意】

- 1)採取した検体(コロニー)は調製方法に従いできる限り早く試料の調製を行い、検査に使用して下さい。
- 2)試料の滴下量は所定の量(5滴)を守って下さい。所定量以外の場合、正確な判断が行われなことがあります。
- 3)テストプレート及び抽出液は15~30℃にしてから使用して下さい。
- 4)菌種により耐性因子の発現量が異なるため、検出が困難となる場合があります。
- 5)妨害物質

下記物質は下記濃度において、本品における判定への影響は認められませんでした。

培地① 平板血液寒天培地(200mg/mL)

培地② 平板BTB乳糖培地(200mg/mL)

ペプトン(5mg/mL)

メルカプト酢酸ナトリウム(3mg/mL)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(10mg/mL)

- 6)交差反応性

・β-ラクタム系薬剤耐性因子:

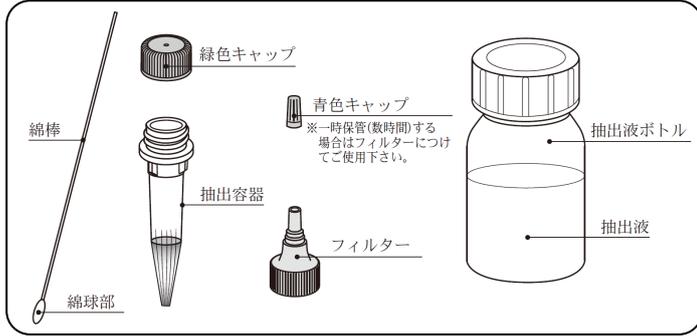
VIM型、NDM型、GIM型、SPM型等のメタロ-β-ラクタマーゼやAmpC、KPC、ESBL等のβ-ラクタマーゼとは交差反応性を示しませんでした。しかし、IMPと類似の構造を有するTMB型、SIM型のメタロ-β-ラクタマーゼとは交差反応性を示す可能性があります。

・アミノグリコシド系薬剤耐性因子:

AAC(6')-Iafとは交差反応性を示しませんでした。しかし、AAC(6')-Ibと類似の構造を有するAAC(6')-31とは交差反応性を示す可能性があります。

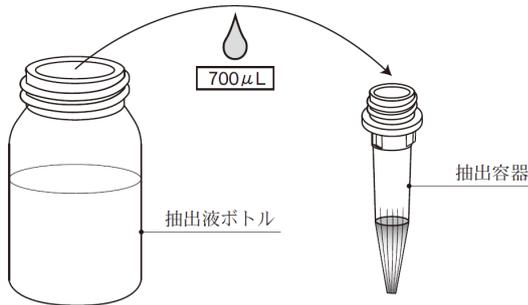
## 【用法・用量（操作方法）】

### ●抽出容器各部名称



### ●抽出液の準備

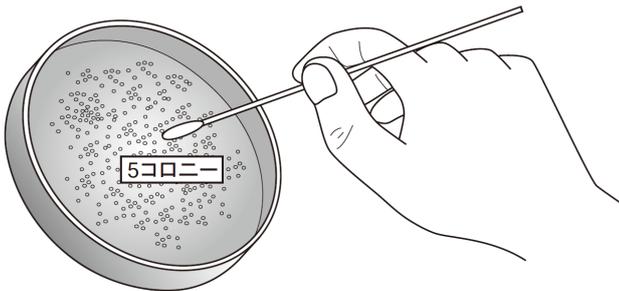
抽出液ボトルから抽出容器に 700 μL 分注します。



### ●試料の調製

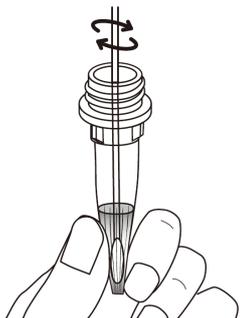
#### ●検体の採取方法

培地上の生育コロニーを 5 コロニー程度採取して下さい。  
※培地によるテストへの影響を避けるため、コロニー採取の際は抽出液への培地の混入を最小限にして下さい。



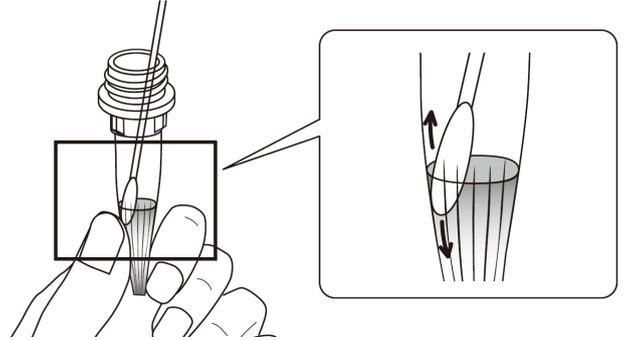
#### ●検体の抽出方法

①コロニーを採取した綿球部を抽出容器の底まで入れて下さい。抽出容器の外から綿球部をささむ様に軽く押さえ、綿棒を 5 回程度左右に回転させ、抽出容器の側面及び底面にこすりつけて下さい。

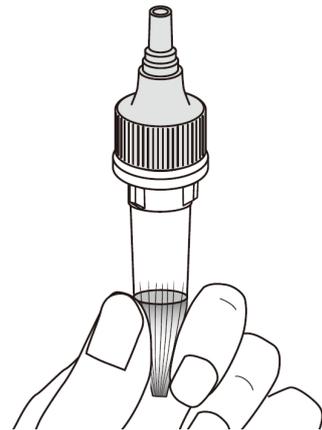


②採取したコロニーを破碎するため、綿球部のコロニーが付着した部分を容器内側の凹凸部分にこすりつけます。この時、抽出液の液面付近で綿球部をこすりつけると、効率良くコロニーを破碎し、抽出液に溶かすことができます。最初から綿球部を奥まで入れると、コロニーが浮遊してうまく破碎できない可能性があります。

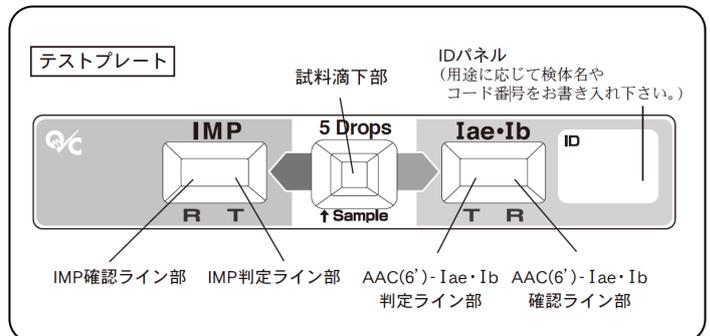
綿球部を抽出容器の外から挟みこみ懸濁を行い、綿球部を絞り出してから綿棒を取り出して下さい。



③フィルターを抽出容器に装着して、容器の溝部分を外側から指ではさんでこすり擦り合わせ、菌塊を細かく壊します。  
※菌塊を細かく壊すことにより、菌体内の IMP 及び Iae、Ib の抽出効率を高めると共に菌塊によるフィルターの詰まりを防ぐことができます。



### ●テストプレート各部名称



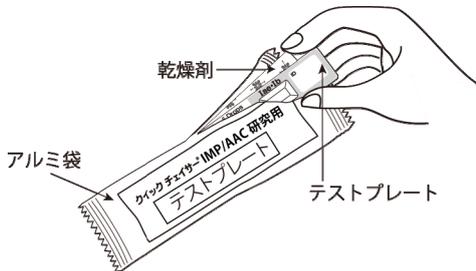
## ●操作方法

### 1) 試薬の調製方法

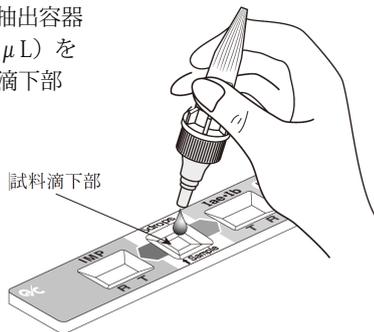
テストプレートはそのまま使用します。

### 2) 測定操作法

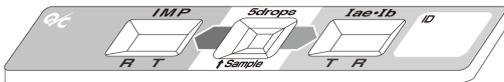
- ①アルミ袋からテストプレートを取り出して下さい。同梱されている乾燥剤は取り除いて下さい。



- ②調製した試料の入った抽出容器から試料5滴（約150μL）をテストプレートの試料滴下部に滴下して下さい。



- ③15～30℃で静置して反応させて下さい。



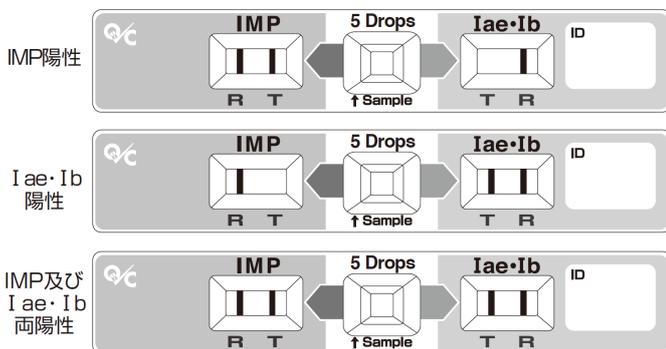
- ④15分後に、目視にて判定ライン部及び確認ライン部に出現するラインで判定して下さい。

### 【測定結果の判定方法】

テストプレートの判定ライン部及び確認ライン部に出現する赤紫色のラインで判定して下さい。

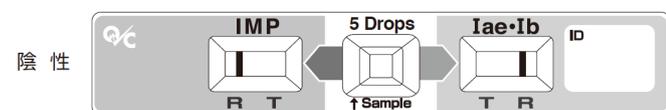
#### 《陽性》

判定ライン部及び確認ライン部ともにラインが出現した場合を陽性と判定して下さい。



#### 《陰性》

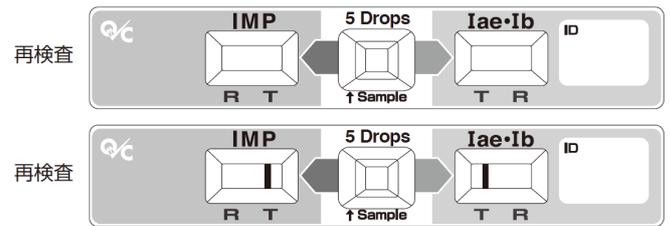
確認ライン部にのみラインが出現した場合を陰性と判定して下さい。



#### 《再検査》

判定ライン部及び確認ライン部ともにラインが出現しない場合または判定ライン部のみにラインが出現し確認ライン部にラインが出現しない場合は、試料量不足等の操作上のミス等が考えられますので、

再度操作方法を確認の上、新しいテストプレートで検査を行って下さい。再検査でも同じ結果になった場合は、他の方法で検査して下さい。



## ●判定上の注意

- 判定は15分後です。金コロイドの流れにより一時的にスジ状のライン等が現れることがありますが、これは判定ラインではありませんのでご注意ください。15分以降、経時的にテストプレートの乾燥等により金コロイドがライン様に現れる場合がありますので所定の判定時間を守って下さい。
- 検体中にIMP及びIae、Ibの遺伝子が検出されても、これらの遺伝子からタンパク質が十分に発現せず本品の検出限界以下となる場合や、検体採取が不十分な場合は陰性と判定されることがあります。
- 免疫反応としてはまれですが、非特異反応を起こし陰性検体が陽性と判定されることがあります。
- 本品においてIaeとIbの検出は区別できず、同一の判定ラインとして出現します。

## 【性能】

### [IMP]

		PCR法		計			SMA法		計
		+	-				+	-	
本品	+	316	0	316	本品	+	282	34	316
	-	0	60	60		-	1	59	60
計		316	60	376	計		283	93	376

緑膿菌248株と腸内細菌128株の計376株について、本品によるIMP（タンパク質）検査と、PCR法による $bla$ IMP（遺伝子）検査との結果を比較すると、 $bla$ IMP（遺伝子）陽性の316株全てにおいて本品は陽性を示し、 $bla$ IMP（遺伝子）陰性の60株全てにおいて本品は陰性を示しました。PCRとの相関は100%でした。

また、本品によるIMP（タンパク質）検査の結果とメタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）の阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）を用いたMBL産生株スクリーニング検査（SMA法）の結果を比較したところ、本品にて陽性となった316株のうちSMA法では282株が陽性であり、SMA法で陰性と示した34株にはPCR法にて $bla$ IMP（遺伝子）の存在が認められました。また、本品にて陰性となった60株のうちSMA法では59株が陰性であり、SMA法で陽性となった1株にはPCR法にて $bla$ IMP（遺伝子）の存在が認められませんでした。

### [AAC(Iae·Ib)]

		PCR法		計
		+	-	
本品	+	215	3	218
	-	7	76	83
計		222	79	301

緑膿菌301株についての本品によるAAC(Iae·Ib)検査と、PCR法による $aac(6')-Iae$ （遺伝子）と $aac(6')-Ib$ （遺伝子）検査との結果を比較すると、 $aac(6')-Iae$ 、 $-Ib$ （遺伝子）陽性の222株中、215株において本品は陽性を示しました。PCRで陽性、本品で陰性となった7検体は、PCRで $aac(6')-Ib$ （遺伝子）が確認されました。AAC(6')-Ibの発現量が本品の検出限界以下であると考えられます。

また、 $aac(6')-Iae$ 、 $-Ib$ （遺伝子）陰性の79株中、76株において本品

は陰性を示しました。PCR で陰性、本品で陽性となった 3 検体は PCR にて *aac(6)-3I*(遺伝子)が確認されました。

アシネトバクター属菌や大腸菌など腸内細菌科からの AAC (I ae・I b) の検出については現在検討中です。

## 【使用上又は取扱い上の注意事項】

### 1)取扱い上(危険防止)の注意

- ①試料(検体)中には感染性のものが存在する場合があります。検査にあたっては感染の危険性があるものとして、取扱いには十分ご注意ください。
- ②使用に際しては、保護具(眼鏡、使い捨て手袋、マスク等)を着用のうえ、試料(検体)や抽出液が直接皮膚に付着したり、目に入ったりしないように注意して下さい。
- ③試料(検体)や抽出液が誤って目や口に入った場合には、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下さい。
- ④付属の青色キャップには密封性はありません。輸送及び保存の目的には使用しないで下さい。
- ⑤試料(検体)の採取は十分習熟した人の指導のもとで行って下さい。
- ⑥テストプレートに使用しているメンブレンの材質はニトロセルロースです。ニトロセルロースは極めて燃焼性が高い為、火気の近くで操作を行わないで下さい。
- ⑦試料(検体)が飛散した場合は消毒用アルコール等を用いてふき取って下さい。

### 2)使用上の注意

- ①本品は研究用試薬です。疾病の治療・診断・予防を目的として使用しないで下さい。
- ②試薬は凍結を避け、貯法に従い保存して下さい。凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないで下さい。
- ③使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- ④抽出液は、横倒やさかさまの状態で保管しないで下さい。
- ⑤アルミ袋開封後のテストプレートはただちに使用して下さい。室内に長時間放置すると、湿気を帯びて反応しないことがあります。
- ⑥テストプレートの試料滴下部、判定ライン部及び確認ライン部には直接手を触れないで下さい。
- ⑦試料の流れに影響を来たしますので、空調機の下など、直接乾燥した風が当たるところでの測定は避けて下さい。
- ⑧試料に含まれる抗原量が本品の検出限界以下の場合、検査結果が陰性となる場合があります。本品での陰性結果は抗原の存在を完全に否定するものではありません。
- ⑨本品中の試薬、付属品等は当検査以外の目的に使用しないで下さい。
- ⑩テストプレート、綿棒、抽出容器(フィルターやキャップ類も含む)は1回のみを使いきりとして下さい。また、他の試薬を本品と組合せて使用しないで下さい。
- ⑪使用前の綿棒の綿球部分には手を触れないようにして下さい。
- ⑫試料の調製後、綿棒を取り出す際に試料が飛び跳ねないように注意して下さい。
- ⑬検体採取量が過剰の場合、フィルターが目詰まりを起こし、適切な量の試料が滴下できない場合があります。その場合は新たに検体採取を行い、検査を行って下さい。

### 3)廃棄上の注意

- ①使用後の抽出容器及びテストプレート、試料(検体)に接触した綿棒は、感染性があるものとして取り扱い、グルタルアルデヒド溶液(2vol%, 1時間以上浸漬)または、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1000ppm 以上、1時間以上浸漬)による消毒処理、あるいはオートクレーブ(121℃, 20分間以上)による滅菌処理を行って下さい。
- ②試薬の抽出液は保存剤としてアジ化ナトリウムを含有しています。

アジ化ナトリウムは、鉛管や銅管と反応して爆発性の強い金属アジドを生成することがありますので、廃棄の際は多量の水と共に流して下さい。

③試薬及び器具等を廃棄する場合には廃棄物に関する規定に従い、医療廃棄物、産業廃棄物または感染性廃棄物として処理して下さい。

## 【貯蔵方法・有効期間】

- ・貯蔵方法 : 室温(1~30℃)
- ・有効期間 : 24ヶ月

## 【包装単位】

### クイック チェイサー<sup>®</sup> IMP/AAC 研究用 10 回用

- ・テストプレート ..... 10 テスト
- ・抽出液(抽出液ボトル) ..... 15mL×1本
- ・付属品 抽出容器 ..... 10本  
綿棒 ..... 10本  
フィルター(抽出液用) ..... 10個  
青色キャップ(抽出液の一時保管用) ..... 10個

## 【参考文献】

- 1)Sekiguchi J. et al.; Antimicrob. Agents Chemother. (2005) 49(9):3734~3742.
- 2)重高ら; 感染症誌. (2006) 80:391~398
- 3)Sekiguchi J. et al.; J. Clin. Microbiol. (2007) 45(3):979~989.
- 4)Sekiguchi J. et al.; J. Infect. Chemother. (2007) 13(6):418~422.
- 5)Kouda S. et al.; J. Antimicrob. Chemother. (2009) 64(1):46~51.
- 6)Kitao T. et al.; J. Antimicrob. Chemother. (2010) 65 (7): 1382~1386.
- 7)Tada T. et al.; J. Microbiol. Methods. (2012) 91(1):114~116
- 8)Notake S. et al.; J. Clin. Microbiol. (2013) 51(6):1762~1768
- 9)霜島ら;第 26 回日本臨床微生物学会総会抄録集 (2015) O-167, 268

### 文献請求及びお問い合わせは

株式会社 ミズホメディー 学術担当窓口  
佐賀県鳥栖市藤木町5番地の4 フリーダイヤル 0120-12-4636  
FAX 0942-85-0335

「クイック チェイサー」は(株)ミズホメディーの登録商標です。

株式会社 ミズホメディー  
佐賀県鳥栖市藤木町 5 番地の 4