

ESIA™ 寒天培地**微生物検査用***Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp) 検出用分離培地

BIO 12/37-11/14

ALTERNATIVE METHODS FOR AGRIBUSINESS

Certified by AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

粉ミルク、乳児用粉末乳、粉ミルクおよび幼児用粉末乳の調製に用いる原材料(デンプン、マルトデキストリン、ラクトセラム、米粉、大豆粉...)、乳児用液体ミルク、豆乳、無水サプリメントおよび試験検体の表面上用

NF VALIDATION 承認の有効期限は、承認書に明示されています。

用途

Cronobacter spp は、乳児用粉末乳が原因となり、重篤な腸炎や髄膜炎を引き起こす新生児の感染症に関連する腸内細菌です。また、院内感染の原因になることもあります。*Cronobacter* spp は、44℃でも発育が可能な耐熱性大腸菌群細菌と考えられています。最初に黄色素性の *Enterobacter cloacae* と関連し、DNA-DNA ハイブリッド法に関する基礎研究において *Enterobacter sakazakii* が1980年に分離されました。この細菌の毒性因子は、未だ判明していません(1、2)。

原理

本製品は、粉末ミルク、乳児用粉末乳、粉ミルクおよび幼児用粉末乳の原材料や酪農業の環境検体などの食品中に存在する *Cronobacter* spp の特異的な検出に用いられます。*Cronobacter* spp は、本培地上で青コロニーを形成します。

キット構成

調製済み培地	
REF AEB150002	ボトル培地 (500 g)
REF AEB520010	平板培地 (90 mm) 20 枚
(ESIA)*	

* 各シャーレに印字

組成**理論値 (g/L)**

性能を確保するため、若干変更される場合があります。

カゼイン胨液消化液 (ウシ).....	7 g
酵母エキス.....	3 g
塩化ナトリウム.....	5 g
デソキシコール酸ナトリウム.....	0.6 g
クリスタルバイオレット.....	0.002 g
X-アルファ-グルコピラノシド.....	0.15 g
寒天.....	15 g
精製水.....	1 L

pH 7.0

必要な器材

- オートクレーブ
- ボトル(オプション)
- 滅菌済もしくは無菌のペトリ皿
- ふ卵器
- ブレンダーバッグ

必要な試薬

- ペプトン緩衝溶液 (品番 42043)
- バンコマイシンサプリメント (品番 412498)
- ID 32 E アピ (品番 32400)
- ラピッド ID 32 E アピ (品番 32700)
- Fast Crono 確認試薬 (品番 417425)

使用上の注意

- 微生物検査にのみご使用ください。
- 熟練者のみご使用ください。
- GLP (Good Laboratory Practices) に従ってください(標準法 ISO7218 の最新版(4))。
- 本培地は、動物由来の原料を含みます。由来に関する情報や由来動物の衛生状態に関する保証は、感染性のある病原体がいらないことを総合的に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、充分注意の上お取り扱いください(摂取または吸入しないでください)。
- 全ての検体、培養物および検体を接種した製品は感染性があるものとして適切にお取り扱いください。被検菌の無菌操作および通常操作に関する一般的な留意事項は以下のガイドラインを参照してください。安全ガイドライン: CLSI® M-29A, Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Appoved Guideline - Current Revision 操作留意事項: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH - Latest Edition または各国の最新のガイドラインに従ってください。
- 本培地を製造原料として使用しないでください。
- 使用期限切れの製品は使用しないでください。
- 包装に損傷が見られる製品は使用しないでください。
- プレートが汚染していたり、培地の水分の浸出している製品は使用しないでください。
- 凝集が認められるなど、均質でない乾燥培地は使用しないでください。
- ボトルの使用後は、きつく閉めてください。
- 湿気(蒸気、結露など)がある環境下でボトルを開けないでください。
- 本使用説明書に記載した使用方法を厳守してください。手順の変更や改変は結果に影響を及ぼすことがあります。

貯蔵条件

- 平板培地: 有効期限まで 2~8℃で箱の中に入れた状態で保管してください。
- ボトル培地: 有効期限まで 1~30℃で保管してください。
- 乾燥している場所で保管してください。

検体

検体の収集や調製方法は、最新の標準法に従ってください。

事前準備

1. 30.8 gのパウダーを1 Lの精製水へ入れます。
2. 完全に溶解するまで沸騰させます。
3. ボトルの中で攪拌します(必要に応じて)。
4. 121°Cで15分オートクレーブにかけてください。
5. 47-50°Cまで冷やし、ペトリ皿に分注します(約18 mL)。

使用法

1. 標準法による *Cronobacter* spp の検出:

ISO/TS22964 標準を参照してください(3)。

2. 本品 ESIA™ One Day 代替法による *Cronobacter* spp の検出:

本法によって、粉ミルク、乳児用粉末乳、粉ミルクおよび幼児用粉末乳の調製に用いる原材料(デンプン、マルトデキストリン、ラクトセラム、米粉、大豆粉...)、乳児用液体ミルク、豆乳、無水サブリメントおよび試験検体の表面上、粉塵、処理水および酪農産業の残留物内に存在する *Cronobacter* spp の特異的検出が可能です。BPW + バンコマイシンブイオンは、*Cronobacter* spp を最適に増殖させ、更に関連する干渉細菌叢の増殖を強力に阻害し、ESIA™ 培地の読み取りを容易にします。(プロトコル参照)

・ 検体準備:

フィルター付きブレンダーバッグで X g(もしくは X mL)を計量します。

10 倍希釈溶液(試験量 50 g 以下):

検体 X g に 9X mL のペプトン緩衝溶液を加えます。

4 倍希釈溶液(試験量: 50 < X ≤ 300 g):

検体 X g に 3X mL のペプトン緩衝溶液を加えます。

調製済み検体にバンコマイシンサブリメントを加え、最終濃度が 6 mg/L になるようにしてください。試験量 25 g をペプトン緩衝溶液 225 mL に希釈した場合、事前に調製したバンコマイシンサブリメント(品番 412498) 1 mL を滅菌済み精製水 6.9 mL に加えて、均質化してください。

・ 前培養方法:

検体は、37°C ± 1°C で 16 ~ 20 時間前培養してください。

注意: 前培養後、環境検体を除き、ESIA™ 平板培地による二次培養まで、前培養サンプルは 2 ~ 8°C で 72 時間保存可能です。

・ 接種および培養:

前培養サンプルから、ESIA™ 平板培地の表面上で従来の画線法を用いて二次培養し、44°C ± 1°C で 24 ± 3 時間培養してください。

注意: 培養後、適切な確認試験の実施および判定まで ESIA™ 平板培地は冷蔵温度で保存可能です(最長 72 時間)。

判定

Cronobacter 属の特徴的なコロニーは、ESIA™ 平板培地上で青色を形成します。

NF Validation のフレームワーク作業工程では、陽性と判定された結果は全て ESIA™ 平板培地で分離した 1 ~ 5 個の特徴的なコロニーを用いて以下の手順から 1 つ用いて確認するよう規定されています:

1. ISO もしくは CEN(精製工程を含む)の標準法に記載されている従来法に従って確認してください。
2. Fast Crono 確認試験(品番 417425)を実施します。選択した特徴的なコロニーに試験一滴を滴下し、3 ~ 5 分待ちます。UV ライト(366 nm)下で蛍光性を観察し、蛍光性コロニーが確認できる場合は、*Cronobacter* spp が形成されています。
3. 同定システム ID 32 E アピ(品番 32400)を用います。ESIA™ 平板培地上で分離された特徴的なコロニーから、添付文書に従って同定システムへ接種、培養し、判定します。属種を同定することで、*Cronobacter* spp の有無を確認します。
4. 同定システムラピッド ID 32 E アピ(品番 32700)を用います。ESIA™ 平板培地上で分離された特徴的なコロニーから、添付文書に従って同定システムへ接種、培養し、判定します。属種を同定することで、*Cronobacter* spp の有無を確認します。

注意: 環境検体および粉ミルク分離物の調製のための原材料で同定システムを用いる確認試験のフレームワークでは、精製工程は必須です。

結果が一致しない場合(ESIA™ 法での陽性結果が、選択された確認法で確認されなかった)、検査室は結果の正当性を確保するために十分な手段を講じてください。

品質管理

本製品は、厳格な品質への要望を満たすよう開発・製造されています。細菌活性に関する菌株試験の結果は、ロットごとに試験成績書に記載されています(ご要望により提供します)。

留意事項

大腸菌群は、ESIA™ 平板培地上で *Cronobacter* spp の特徴的なコロニーと容易に区別できるように紫コロニーを形成します。

廃棄処理

未使用の製品は、通常の化学物質廃棄物の処理手順に従って処分してください。使用済み製品およびその他の汚染廃棄物は全て、感染性もしくは感染の危険のある製品の取扱い方法に従って処分してください。

廃棄物や廃液はそれぞれの性質や危害度合いを考慮した上で、地域の適切な規制に基づき、各検査室の責任において処分してください。

参考文献

1. Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. and Ferguson, J. 1989. Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. Infect Control Hosp Epidemiol. 10:398-401.
2. Van Acker, J., De Smet, F., Muyldermans, G., Bougatef, A., Naessens, A. and Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with Enterobacter sakazakii in powdered milk formula. J Clin Microbiol. 39:293-297.
3. ISO/TS 22964 : Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii.
4. ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.

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
	直射日光を避けること
	製造日
	湿気厳禁

(問い合わせ先)

製品関連

シスメックス株式会社 CS センター

臨床(病院、臨床検査センターなど) TEL: 0120-265-034

産業(企業、保健所など) TEL: 0120-022-328

注文・納期・在庫関連

シスメックス・バイオメリュー株式会社

TEL: 03-6834-2669(代表)



シスメックス・バイオメリュー株式会社

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: 03-6834-2669 / Fax: 03-6834-2667

<http://www.biomerieux.co.jp>

bioMérieux SA

Chemin de l'Orme

69280 Marcy-l'Etoile - France

RCS LYON 673 620 399

Tel. 33 (0)4 78 87 20 00

Fax 33 (0)4 78 87 20 90

www.biomerieux.com