

354226-5

抗酸菌用蛍光染色液

アクリステイン mAO液
アクリステイン CS液
アクリステイン WB液

近年の抗酸菌検査では、核酸増幅法など高い検査精度を有しながら、短時間で結果が得られる検査方法が開発されていますが、その一方で、検査コストが安く、菌量も確認できる塗抹染色の重要性も唱えられております。

本品は、抗酸菌検査ガイド 2020¹⁾ に記載されているアクリジンオレンジ染色法による抗酸菌蛍光染色液です。今回、「アクリステイン mAO 液」による抗酸菌の染色性向上と「アクリステイン CS 液」及び「アクリステイン WB 液」による脱色、後染色、洗浄によって背景の発色を低減することを目的とした改良を実施しました。改良の結果、従来品よりも桿菌の形態が確認し易くなり、多検体鏡検時での検査者の負担を軽減することも期待できます。²⁾

本品を使用する際は、染色中における検体の剥離防止のため、「MAS コートガラス」(別売品)の使用を推奨します。

**【形状・構造等(キットの構成)】

構成試薬名	包装内容	主成分名	付属品
アクリステイン mAO 液 医薬用外劇物 (フェノール 6.7%含有)	250mL	アクリジンオレンジ フェノール エタノール グリセリン	ノズルキャップ (1個)
アクリステイン CS 液	450mL	Eriochrome Black T 塩酸 エタノール	ノズルキャップ (1個)
アクリステイン WB 液	450mL	EDTA トリス(ヒドロキシメ チル)アミノメタン	ノズルキャップ (1個)

【使用目的】

抗酸菌用蛍光染色

【染色原理】

アクリジンオレンジ色素は DNA 鎖、RNA 鎖と結合する性質を持っています。フェノールの作用により抗酸菌の菌体内にアクリジンオレンジ色素が取り込まれ、核酸を染色します。次にアクリステイン CS 液に含まれる塩酸アルコールにより抗酸菌以外の細菌を脱色すると同時に Eriochrome Black T で後染色を行います。Eriochrome Black T の色調は pH によって変化するため、pH8.0 の Tris-HCl/EDTA 緩衝液で洗浄することで背景の発色を抑えます。これら一連の操作により、抗酸菌のみ蛍光観察できます。

【特長】

- アクリジンオレンジを用いた抗酸菌用蛍光染色液です。
- 抗酸菌検査ガイド 2020 に記載のオーラミン蛍光染色と同等の感度・特異度を有します。
- ハレーションを抑えることで、抗酸菌の形態観察が容易です。
- 脱色・後染色・洗浄が 2 ステップで行えます。
- 染色時間が短縮化され、より簡便に染色を行う事ができます。
- 室温で長期保存が可能です。
- 剥離防止用スライドガラス「MAS コートガラス」の使用により、染色中の検体剥離防止が可能になりました。

*【必要な器具・器材・試料等】

スライドガラス
マイクロピペット又は白金耳
ガスバーナー又はホットプレート

蛍光顕微鏡

(励起フィルター490nm/ 吸収フィルター510nm 以上)
フィルター型番については、各メーカーにお問合せ下さい。

【操作上の注意】

一連の操作を行う際はセーフティキャビネット及び安全保護具を使用し、感染予防上十分注意して下さい。

【操作方法】

1. 塗抹標本の作製

鏡検時のバックグラウンドを抑える為、(SAP)NALC-NaOH 処理後の検体を塗抹することを推奨します。弊社「アシッドプラス」(別売品)等の酸処理後の検体も染色できます。

直接塗抹の場合は、上皮細胞等の非特異蛍光により、鏡検し難い場合があります。

剥離防止用スライドガラス「MAS コートガラス」を使用することを推奨します。

(1) NALC-NaOH 処理後の沈渣をマイクロピペット又は白金耳を使用しスライドガラスに塗抹します。

(2) 塗抹標本を自然乾燥させた後、火炎固定します。

※ガスバーナー及びホットプレートにより固定できます。この時、加熱し過ぎると脱色が困難になりますのでご注意ください。

2. 染色操作

(1) 開封時は「アクリステイン mAO 液」、「アクリステイン CS 液」及び「アクリステイン WB 液」の平キャップを外し、付属のノズルキャップにつけかえます。本品はノズルキャップのまま保管することができます。

(2) 塗抹標本に「アクリステイン mAO 液」を満載し、室温で 15 分間静置します。

(3) 満載した「アクリステイン mAO 液」を捨て、塗抹面の橙色が出なくなるまで、約 10~20 秒間静かに水洗します。水洗後、軽く水を切ります。

(4) (3)の塗抹標本に「アクリステイン CS 液」を満載し、室温で 1 分間静置します。後染色時間は 2 分間を越えないようにして下さい。

※「アクリステイン CS 液」は脱色と後染色作用を兼ねています。後染色時間が長いと、脱色・後染色が過剰となり抗酸菌の輝度が低下することがあります。

※菌液などの残渣物の少ない検体を塗抹した場合は、「アクリステイン CS 液」による後染色を 1 分間とします。

(5) 満載した「アクリステイン CS 液」を捨て、「アクリステイン WB 液」で、塗抹面の青色が出なくなるまで、十分に洗浄します。

(6) 洗浄後、「アクリステイン WB 液」を塗抹標本に満載し、10 秒静置します。

(7) 10 秒静置後、満載した「アクリステイン WB 液」を捨てます。

(8) 標本を立てる等して速やかに自然乾燥させるか、又はドライヤーで塗抹面を十分乾燥させます。

※ろ紙による吸水は、繊維等が非特異蛍光を発生し鏡検の妨げになりますので使用しないで下さい。

※染色後の標本は光に不安定な為、鏡検するまでアルミホイル等で遮光し保管します。

3.鏡検判定方法

- (1) 蛍光顕微鏡を準備します。励起フィルターを490nm、吸収フィルターを510nm以上にセットします。

※蛍光色素の種類により適合する励起及び吸収フィルターの波長が異なります。適合しない波長の場合、蛍光を確認できませんのでご注意ください。

- (2) 200倍拡大で鏡検し、明瞭な桿菌を陽性とし、球菌状・顆粒状のものは陽性としません。
200倍拡大で桿菌の形態確認が困難な部分は400倍拡大で確認し、最終判定とします。

抗酸菌：黄色～橙色の明瞭な桿菌
背景：黒色～暗緑色
残渣等：緑色～暗緑色

※本品は、抗酸菌の状態によっては橙黄色調に差が生じることがありますが、蛍光を発する桿菌を抗酸菌と判定します。

※本品は、一般細菌等では蛍光を発しませんが、酵母様真菌等抗酸性を有する菌では非特異蛍光(黄緑色若しくは緑色)を発する場合があります。抗酸菌検出時は桿菌の形態を確認し判定します。

※400倍拡大においても桿菌が不明瞭な場合は、チール・ネールゼン染色又はキニヨン染色で確認します。鏡検後の染色標本は、チール・ネールゼン染色又はキニヨン染色に使用することができます。

※油浸オイルは、各顕微鏡メーカーの推奨する無蛍光オイルを使用して下さい。

※染色標本中の菌数は、抗酸菌検査ガイド2020の記載法(下記表参照)に従って記録して下さい。

鏡検における検出菌数記載法¹⁾

記載法	蛍光法(200倍)
—	0/30視野
±	1~2/30視野
1+	1~19/10視野
2+	>20/10視野
3+	>100/1視野

【精度管理方法】

染色試薬及び染色工程等をチェックする為に、染色毎に精度管理を行う事を推奨します。

1.方法

- (1) 陽性コントロール^{*1}、陰性コントロール^{*2}の菌株を準備します。コントロールには、微生物株分与機関などから入手した標準菌株をご使用下さい。

※1 陽性コントロール：抗酸菌株

(例) *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177)、*M. bovis* BCG 東京株 (KK12-02)、*M. kansasii* (ATCC12478) など

※2 陰性コントロール：抗酸性のない菌株

(例) *Escherichia coli* (ATCC25922) など

- (2) 冷却した滅菌生理食塩水又は精製水でMcFarland No.1濁度の菌液を調製し、スライドガラス上に各コントロール菌液を一滴ずつ塗抹します。

- (3) 自然乾燥後、火炎固定します。

- (4) 本品の操作法に従い、染色、鏡検します。

2.判定

以下のような場合は、コントロールの不良とされます。染色試薬、染色操作、使用した精製水、検体間の汚染、顕微鏡の整備等を確認し再試験を行います。

- ・陽性コントロールが蛍光を発しないか、又は鈍い。
- ・陰性コントロールが蛍光を発する。
- ・背景が脱色されない、又は蛍光を発する。

**【使用上または取扱い上の注意】

1.取扱い上(危険防止)の注意

- (1) 微生物の取扱いに習熟した人の指導のもとにバイオハザード対策を実施した上で使用して下さい。
- (2) 本品を取扱う場合には、必ず白衣、マスク、保護メガネ、手袋等を着用して下さい。
- (3) 本品が目や口に入った場合には、水で十分に洗い流し、必ず医師の手当て等を受けて下さい。
- (4) 本品は必ず室温保管して下さい。

2.使用上の注意

- (1) 染色操作中、スライドガラス上にアクリステイン mAO 液成分の析出や濁りが認められることがありますが、鏡検像には影響はありません。
- (2) 容器を移し替える場合など、遮光にご注意下さい。
- (3) 本品は抗酸菌専用染色液ですので、レジオネラ染色用や一般細菌単染色用には使用できません。
- (4) 有効期限切れの製品は使用しないで下さい。
- (5) 容器の破損、異物混入等が認められるものは使用しないで下さい。
- (6) 使用説明書に記載された操作方法以外については保証致しません。

3.廃棄上の注意

- (1) 試薬を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法、毒物及び劇物取締法等の規制に従って処理して下さい。
- (2) 操作に使用した器具類は、必ず高圧蒸気滅菌(121℃、30分以上)後、適切な処置を行い廃棄して下さい。
- (3) 「アクリステイン mAO 液」はフェノール6.7%を含んでいますので、製品及び廃液などの取扱いには十分注意して下さい。使用後の廃棄方法については、各自治体の医療系産業廃棄物又は医療系一般廃棄物並びに産業廃棄物・一般廃棄物の区分けが異なる為、各自治体の指示に従い廃棄して下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

品名	貯蔵方法	有効期間
アクリステイン mAO 液	室温、遮光	4ヶ月
アクリステイン CS 液	室温、遮光	6ヶ月
アクリステイン WB 液	室温、遮光	6ヶ月

【包装】

コードNo.	品名	包装
08373	アクリステイン mAO 液	250mL
08374	アクリステイン CS 液	450mL
08375	アクリステイン WB 液	450mL

【別売品】

コードNo.	品名	包装
08700	アシッドプラス	200mL
65340	剥離防止用スライドガラス MAS コートガラス	100枚入

【参考文献】

- 1.日本結核・非結核性抗酸菌症学会：抗酸菌検査ガイド2020。一般社団法人日本結核・非結核性抗酸菌症学会、2020、p.33-38。
- 2.五十嵐ゆり子、他：臨床検体における改良型アクリジンオレンジ蛍光染色液の抗酸菌染色性評価及び抗酸菌基準株に対する染色像の比較。日本臨床微生物学会雑誌、29、2019、p.12-16。

【問い合わせ先】

極東製薬工業株式会社 営業学術部
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7-8
電話 03(5645)5664
FAX 03(5645)5703

製造販売元

 極東製薬工業株式会社
茨城県高萩市上手綱朝山3333-26

本社住所 東京都中央区日本橋小舟町7-8