

【使用上または取り扱い上の注意事項】

1) 使用上の注意事項

- ① 本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された試験方法に従って使用してください。
- ② 本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各操作手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
- ③ 使用期限の過ぎたキットは使用しないでください。使用期限はキット外装ラベルおよびテストストリップアルミ包装に記載されています。
- ④ 本キットは食品中もしくは分離されたコロニーからVT1 およびVT2を検出するための試薬であり、臨床的診断を下す目的で使用することはできません。
- ⑤ 試料中の成分もしくはペロ毒素の濃度の影響により、偽陽性が示される可能性があります。本キットで陽性を示した試料については、他の方法により、必ず確認を行ってください。
- ⑥ 試料溶液の調製に使用する器具ならびに試薬類(培地を含む)の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
- ⑦ 商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

2) 危険防止上の注意事項

- ① 本キットの検出対象であるペロ毒素は微量でも非常に強い毒性を示します。また、大腸菌をはじめとする微生物による感染の可能性もあるため、試験を実施する際には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど十分留意してください。
- ② 試験を実施する際には、適切な設備・施設で行い、責任ある管理者の指導のもとで標準的な微生物検査手順にて実施してください。
- ③ 誤って試料溶液等が目や口に入った場合には、直ちに水道水で洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。
- ④ 本キットによる試験実施後、身体に異常を感じた場合には、直ちに医師の手当てを受けてください。

3) 廃棄上の注意事項

- ① 試験に使用したテストストリップや増菌培地、試料および試料溶液の残り等は、感染の可能性があると考え、必ずオートクレーブ処理(121℃、20分)、もしくは0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸すなどの適切な滅菌処理を施してください。
- ② 本キットならびに試料および試料溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮し廃棄してください。

【貯法・使用期限】

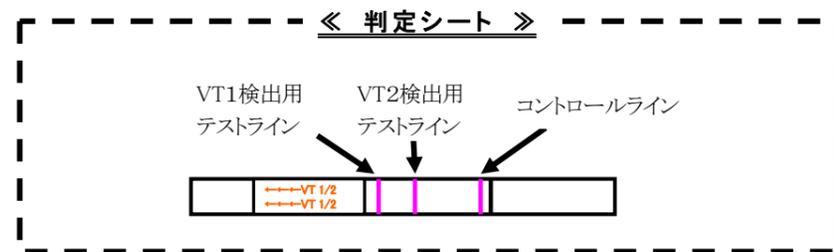
- 1) 貯法： 冷蔵(2~8℃)、遮光にて保存してください。また、凍結は避けてください。
- 2) 使用期限： 製造日より12ヶ月。

【包装単位】

NH イムノクロマト VT 1/2 20テスト入

【参考文献】

- 1) 甲斐明美ら:臨床と微生物, 23, 827-834(1996).
- 2) 厚生労働省「腸管出血性大腸菌 O157 および O26 の検査法について」(平成18年11月2日食安監発1102004号)



【販売元および問い合わせ先】

キット外装ラベルに記載

【製造元】

〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3
 日本ハム株式会社 中央研究所
 電話:029(847)7825/FAX:029(847)7824
 URL: <http://www.rdc.nipponham.co.jp>

【食品検査用試薬】

NHイムノクロマトVT 1/2 《取扱説明書》

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

大規模な食中毒や死亡例が報告されている腸管出血性大腸菌は、これらが産生するペロ毒素(Verotoxin, VT)により症状を示します。このペロ毒素は抗原性の異なるペロ毒素1型(VT1)とペロ毒素2型(VT2)に大別され、非常に強力な毒性を有することが知られています。

日本国内ではO157、O26をはじめとして多数の血清型が検出されており¹⁾、検査法²⁾の通知されているO157 およびO26 以外の腸管出血性大腸菌による食中毒を防止するためには、食品中のペロ毒素の確認が有効となります。また、腸管出血性大腸菌は、ペロ毒素産生性の確認より確定されるため、腸管出血性大腸菌が検出された場合には、ペロ毒素の検査を行う必要があります。

本品は、イムノクロマト法を用いたペロ毒素検出キットで、簡単な操作で短時間にVT1 およびVT2 の検出と識別が可能です。

【本品の特徴】

- 1) 1ステップの簡単な操作のため、習熟を必要としません。
- 2) 迅速に結果が得られます。
- 3) 特別な検出装置を必要としません。

【キットの内容】

1) 構成品

- A: テストストリップ…………… 2テスト×10
- B: 取扱説明書…………… 1部
- C: ビニールパウチ袋…………… 1枚

2) 成分

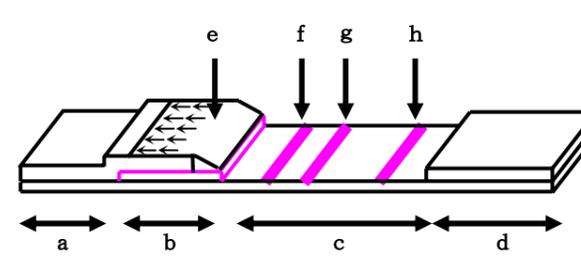
- ① 試薬含有部
 金コロイド標識抗VT1抗体(ウサギ)
 金コロイド標識抗VT2抗体(ウサギ)
- ② 展開部
 抗VT1抗体(ウサギ)
 抗VT2抗体(ウサギ)
 抗ウサギ免疫グロブリン抗体(ヤギ)

【目的】

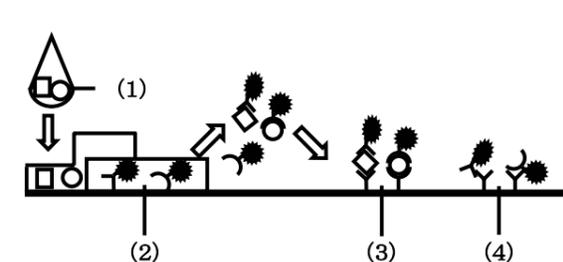
- 1) 食品に含まれるVT1 およびVT2 の検出。
- 2) 分離された腸管出血性大腸菌からのVT1 およびVT2 の産生性確認

【テストストリップ各部名称および検出原理】

1) テストストリップ各部名称



2) 検出原理



- a. 試料滴下部(手で触れないよう注意してください。)
- b. 試薬含有部
- c. 展開部(手で触れたり、キズをつけないよう注意してください。)
- d. 吸収パッド
- e. 測定項目記載位置
- f. VT1 検出用テストライン出現位置(試料滴下部より約28mm)
- g. VT2 検出用テストライン出現位置(試料滴下部より約32mm)
- h. コントロールライン出現位置(試料滴下部より約40mm)

テストストリップの試料滴下部に試料溶液を滴下すると、試薬含有部に含まれる金コロイド標識抗VT1抗体および金コロイド標識抗VT2抗体(2)が溶解し、試料溶液中のペロ毒素(1)と複合体を形成します。これらの複合体は展開部を毛細管現象により移動し、テストライン出現位置に固定化された抗VT1抗体および抗VT2抗体(3)に捕捉され、金コロイドによる赤紫色のラインが出現します。本キットはこの赤紫色のラインを目視により確認し、試料溶液中のVT1およびVT2の有無を判定します。

一方、試料溶液中のペロ毒素の有無に関わらず、余剰の金コロイド標識抗体が展開部をさらに移動し、コントロールライン出現位置に固定化された抗ウサギ免疫グロブリン抗体(4)に捕捉され、赤紫色のラインを形成します。このラインの有無により、試料溶液が展開部を正常に移動したことを確認します。

【試料溶液の調製1(食品からの検出)】

1) 必要な機器・器材

ストマッカー袋(フィルター付を推奨)、ストマッカー、インキュベーター、オートクレーブ、マイクロピペットおよびチップ、遠心分離機、恒温水槽、ノボピオシン加mEC 培地、ポリミキシン B 溶液、他

2) 試料の調製

- 被検食品 25g をストマッカー袋に秤量して試料としてください。
- ストマッカー袋中の試料 25g に対して、ノボピオシン加mEC培地 225mL を加え、1 分間ストマッカー処理を行ってください。
- ストマッカー袋ごと、42℃で 18～24 時間培養してください。
- 培養終了後、ストマッカー袋をインキュベーターより取り出し、培養液の飛散に注意しながら、緩やかに攪拌してください。
- 滅菌済みピペットを用いて、培養液1mL を滅菌済み容器に分注してください。
- 分注した培養液に対し、終濃度 0.5mg/mL となるようにポリミキシン B 溶液を加えてください。
- ポリミキシン B 溶液を加えた培養液を、37℃の恒温水槽中で 30 分間加温してください。
- 30 分後、培養液を室温に戻し、試料溶液としてください。

- 注1: 感染性のある試料溶液を用いるため、試験実施時には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど、感染防止の対策を行ってください。
- 注2: ポリミシン B 処理を行う際は、菌体が沈殿しないよう 5～10 分ごとに振とうすることを推奨します。
- 注3: ポリミキシン B 処理後、懸濁液もしくは培養液を 1,500×g、15 分間遠心分離を行うことを推奨します。
- 注4: 培養液の残りは、本キット試験実施後の確定試験に使用できる可能性があるため、試験終了後まで滅菌せず保存してください。

【試料溶液の調製2(分離コロニーからの検出)】

1) 必要な機器・器材

インキュベーター、オートクレーブ、マイクロピペットおよびチップ、遠心分離機、恒温水槽、CAYE 培地、CAYE プイオン添加剤、腸管出血性大腸菌用分離培地、ポリミキシン B 溶液、他

2) 試料の調製

2)-1 腸管出血性大腸菌用分離培地を用いる場合

- 被検コロニーを腸管出血性大腸菌用分離培地に接種し、37℃、18～24 時間培養してください。
- 培養後、培地表面のコロニーを採取し(平板培地の3分の1～全面)、0.5mg/mL ポリミキシン B 溶液1mL に懸濁させてください。
- 懸濁液を 37℃の恒温水槽中で 30 分間加温してください。
- 30 分後、懸濁液を室温に戻し、試料溶液としてください。

2)-2 CAYE 培地を用いる場合

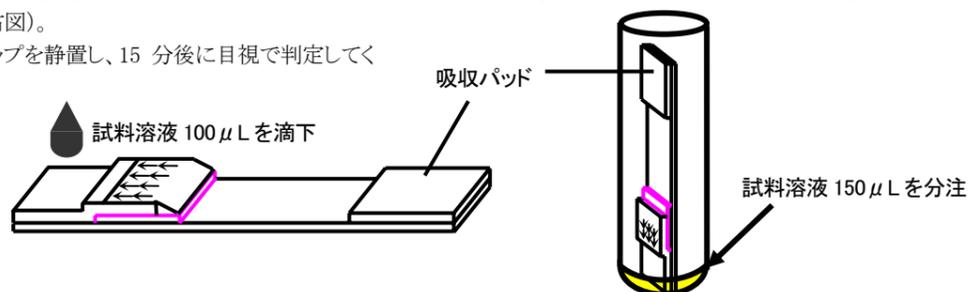
- 被検コロニーを CAYE 培地(添加剤を含む) 1mL に接種し、37℃、6～24 時間培養してください。
- 培養後、終濃度 0.5mg/mL となるようにポリミキシン B 溶液を加えてください。
- ポリミキシン B 溶液を加えた培養液を、37℃の恒温水槽中で 30 分間加温してください。
- 30 分後、培養液を室温に戻し、試料溶液としてください。

- 注1: 感染性のある試料溶液を用いるため、試験実施時には保護手袋、保護メガネ等を着用するなど、感染防止の対策を行ってください。
- 注2: ポリミシン B 処理を行う際は、菌体が沈殿しないよう 5～10 分ごとに振とうすることを推奨します。
- 注3: ポリミキシン B 処理後、懸濁液もしくは培養液を 1,500×g、15 分間遠心分離を行うことを推奨します。
- 注4: 培養液の残りは、本キット試験実施後の確定試験に使用できる可能性があるため、試験終了後まで滅菌せず保存してください。

【試験操作】

1) NH イムノクロマト VT 1/2 試験操作

- テストストリップをアルミ包装のまま室温に戻し、使用直前にアルミ包装から取り出してください。
- 取り出したテストストリップの吸収パッドに油性ペン等を用いて、試料名もしくは検体番号等を記入してください。
- テストストリップを水平な台の上に静置し、試料滴下部に試料溶液 100 μL 滴下してください(下記左図)。もしくは、試料溶液 150 μL を試験管に分注し、テストストリップの試料滴下部が試料溶液に浸かるようにテストストリップを試験管に添加してください(下記右図)。
- テストストリップを静置し、15 分後に目視で判定してください。



- 注1: テストストリップは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、室温に戻してからアルミ包装から取り出してください。また、使用しないテストストリップは乾燥剤とともにビニールパウチ袋に入れ冷蔵保存してください。

注2: テストストリップの試料滴下部および展開部には、直接手などで触れたり、キズをつけないよう注意してください。テストストリップを持つ場合には、吸収パッドを持つようにしてください。

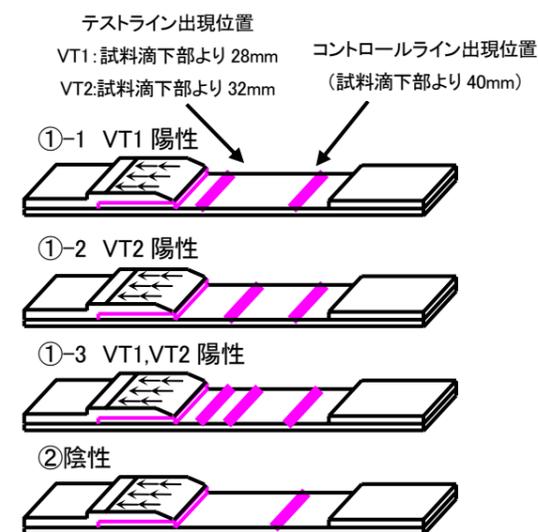
注3: 試料溶液を滴下もしくは分注するために使用するピペットもしくはチップは必ず滅菌済みのものを使用し、試料溶液ごとに交換してください。

注4: 試料溶液 100 μL を滴下する際には、テストストリップから溢れないよう注意し、必要に応じ、2 回に分けて滴下するなどしてください。

注5: 試料溶液を滴下して試験を行う際には、テストストリップの下にラップなどを敷いて試験を行うことをお勧めします。

2) 結果の判定(取扱説明書末尾の判定シートをご利用ください)

- ①-1 試験開始 15 分後に VT1 テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察される場合には、VT1 陽性と判定してください。
- ①-2 試験開始 15 分後に VT2 テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察される場合には、VT2 陽性と判定してください。
- ①-3 試験開始 15 分後に VT1 テストライン出現位置、VT2 テストライン出現位置、およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察される場合には、VT1 および VT2 陽性と判定してください。
- ② テストライン出現位置に赤紫色のラインが認められず、コントロールライン出現位置にのみ赤紫色のラインが観察される場合には、陰性と判定してください。
- ③ コントロールライン出現位置に赤紫色のラインが認められない場合には、テストライン出現位置における赤紫色のラインの有無に関わらず、再試験としてください。試料溶液の展開に異常があった可能性があります。



注1: 本キットで陽性と判定された試料については、PCR 法等、その他の方法にて必ず確認試験を実施してください。

注2: 高濃度の VT1 もしくは VT2 が試料溶液中に存在する場合、VT1 テストラインおよび VT2 テストラインともに観察される可能性があります。

【性能】

1) 感度試験

本取扱説明書に記載された「試料溶液の調製」および「試験操作」に従い試験を行うとき、VT1 および VT2 ともに、2.5ng/mL 以上のとき陽性を示します。

2) 再現性試験

VT1 もしくは VT2 の試料溶液、および陰性の試料溶液(ノボピオシン加mEC 培地および CAYE 培地)を各 3 回同時に試験するとき、陽性の試料溶液はすべて陽性、陰性の試料溶液はすべて陰性を示します。

3) 最小検出感度

精製 VT1 および VT2 による試験結果、VT1 および VT2 ともに 2.5ng/mL が最少検出感度であることが確認されています。

注1: 本キットの最小検出感度は、試料中の成分の影響により、変動する場合があります。

4) 交差反応性

- 以下の菌株との交差反応性は認められませんでした。

	管理番号	15分判定結果
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43888, 700728, 25922, 11775	—
<i>Escherichia hermanii</i>	JCM 1473	—
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047, 49141	—
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 8724	—
<i>Serratia liquefaciens</i>	ATCC 27592	—
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 8100	—
<i>Serratia odorifera</i>	ATCC 33077	—
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	—