

ご使用の際は、添付文書をよくお読みください

逆受身ラテックス凝集反応法による大腸菌ペロトキシン検出用キット

ペロトックス-F 「生研」

【一般的な注意】*

1. 本品は食品関連試薬でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 添付文書以外での使用方法については、結果の信頼性を保証致しません。
3. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。
4. 本品の構成試薬の一部には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入れたり、皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
5. 試薬容器、付属品等は当検査以外の目的に転用しないでください。

【形状・構造等(キットの構成)】*

- | | | |
|------------------------------|--------|----|
| 1. 感作ラテックスVT1 (液剤) | 5mL | 1本 |
| 抗ペロトキシン1型ウサギポリクローナル抗体感作ラテックス | | |
| 2. 感作ラテックスVT2 (液剤) | 5mL | 1本 |
| 抗ペロトキシン2型ウサギポリクローナル抗体感作ラテックス | | |
| 3. 対照ラテックス (液剤) | 5mL | 1本 |
| 4. 対照ペロトキシン1型 (凍結乾燥剤) | 0.5mL分 | 1本 |
| 5. 対照ペロトキシン2型 (凍結乾燥剤) | 0.5mL分 | 1本 |
| 6. 希釈液 (液剤) | 50mL | 1本 |

【使用目的】

食品由来の大腸菌のペロ毒素の検出

【測定原理】

ペロトキシンに対する特異抗体を感作したラテックス粒子は、試料中のペロトキシンと反応して凝集を起こします。本品はこの抗原抗体反応を利用した逆受身ラテックス凝集反応法を測定原理としています。

【操作上の注意】*

測定試料の性質、採取法

1. 本品の使用にあたっては、「厚生省監修微生物検査必携」¹⁾等の方法に従って食品材料から分離され大腸菌と同定された菌株を検体としてください。また、菌株は必ず純培養であることを確認してください。複数の株が混在している場合には正しく検出できない可能性があります。
2. 試料の調製法には寒天培地を用いる静置培養法と液体培地を用いる振盪培養法がありますが、ペロトキシン低産生株では静置培養法の方が高い産生を示す傾向があります。振盪培養法は多数検体を試験する場合に好適ですが、培養条件の影響を受けやすく、至適条件でない場合にペロトキシン産生量が低下し正確な結果が得られない危険性があります。また、ペロトキシン産生の極めて低い株の中には、至適条件下の振盪培養法でも本品の検出感度までペロトキシンが産生されない株がありますので、基本的には静置培養法をお勧めします。
3. 菌株は必ず純培養であることを確認してください。複数の株が混在している場合には正しく検出できない可能性があります。
4. 培養は必ず指定の培地を用いて行ってください。培地によってはペロトキシン産生が低下し偽陰性となる可能性あるいは、菌株によっては非特異的な反応を生ずることがあります。

5. *Enterobacter cloacae*²⁾, *Citrobacter freundii*³⁾など大腸菌以外の菌にもペロトキシンを産生する株があることが報告されています。検体は必ず大腸菌と同定された株を用いてください。
6. 培養液及び抽出液の遠心分離終了時は、菌体が完全に沈降していることを確認してください。上清が濁っている場合は時間を延長して再び遠心操作を行ってください。
7. 培養後の菌体、培養液はただちに処理を行ってください。逆受身ラテックス凝集反应用試料を保存する場合は-20℃以下に凍結して保存してください。

【用法・用量(操作方法)】*

1. 準備する器具及び試薬

- 1) ペロトックス-F 「生研」
- 2) ピペット(1mL)
- 3) 96ウェルマイクロプレート(V)
- 4) ダイリューター(25μL, 又は25μLマイクロピペット)
- 5) ドロッパー(25μL, 又は25μLマイクロピペット)
- 6) マイクロプレート用ミキサー
- 7) その他(黒紙, プレートカバー, マーキング用テープ, 湿潤箱)
- 8) 遠心分離機(900×g以上:卓上型遠心機で約3 000rpm以上)

<静置培養法を用いる場合>

- 1) BHI寒天培地*¹⁾(通気キャップをつけた容量約30mLの試験管に10mLの培地を斜面としたもの。又は9cmシャーレに20mLの培地を加えた平板培地。)培地組成は最後尾に別記。
- 2) ポリミキシンB溶液(硫酸ポリミキシンBを5 000単位/mLを含む生理食塩液で、1mLずつ遠心分離可能な容器にいれたもの。)
- 3) 37℃孵卵器, 37℃恒温水槽, 白金耳

<振盪培養法を用いる場合>

- 1) CAYE培地*²⁾(通気キャップを付けた容量約30mLの試験管に3mLの培地をいれたもの。)培地組成は最後尾に別記。
- 2) 振盪培養器(37℃, 120~150rpm)

2. 試薬の調製

感作ラテックスVT1, 感作ラテックスVT2, 対照ラテックス及び希釈液はそのまま使用します。対照ペロトキシン1型, 対照ペロトキシン2型は希釈液の0.5mLを加え溶解して使用します。溶解後の対照ペロトキシンは2~10℃に保存し、3箇月以内に使用してください。3箇月以上の保存が必要な場合は小分けして-20℃以下に凍結して保存してください。ただし、凍結融解は繰り返さないでください。また、試薬使用時には常温(15~25℃)に30分間以上放置してから使用してください。

3. 検体の調製

A. 静置培養法

- (1) 被検大腸菌株をBHI寒天培地表面の全面に接種して37℃で16~20時間培養します。
- (2) 培地表面に増殖した菌体を掻き取り(マッチ棒の頭3倍程度:斜面培地の全面又は平板培地の1/3から全面に相当します。菌量が少ない場合には低産生株で正しい結果が得られない可能性があります), 1mLのポリミキシンB溶液に浮遊します。
- (3) 37℃で5~10分毎に振盪を加えながら30分間反応させます。
- (4) 浮遊液を900×g, 15分間遠心分離して採取した上清を逆受身ラテックス凝集反應用試料とします。

B. 振盪培養法

- (1) 被検大腸菌株をCAYE培地に接種して37℃で 16～20時間振盪培養します。
- (2) 十分に混濁したことを確認した培養液を900×g, 15分間遠心分離して採取した上清を逆受身ラテックス凝集反応用試料とします。

※振盪培養法は培養条件の影響を受け易いため、培養時に指定条件であることを必ず確認してください。至適条件下では、通常650nmの吸光度で6～7程度まで菌体の増殖が見られます。至適条件でない場合にはペロトキシン産生が大きく低下することがあります。このような場合、ペロトキシン高度産生株では判定を誤ることはありませんが、中低度産生株では偽陰性となる可能性があります。また、好氣的条件が不十分であると、菌の代謝が変化し好氣的条件下と異なる物質を産生するために陰性像が不鮮明となる現象が生じる可能性があります。

4. 操作法

逆受身ラテックス凝集反応(下記の表及び図を参照してください。)

表：希釈方法

ウェルNo.	1	2	3	4	5	6	7	8
希釈倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	対照
希釈液 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25
試料 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25
感作ラテックス又は対照ラテックス (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25

図：マイクロプレートの使用方法

- A：感作ラテックスVT1
- B：感作ラテックスVT2
- C：対照ラテックス

対照	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:128	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:64	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:32	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:16	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	1型	2型
	試料No.1			試料No.2			試料No.3			対照ペロトキシン	

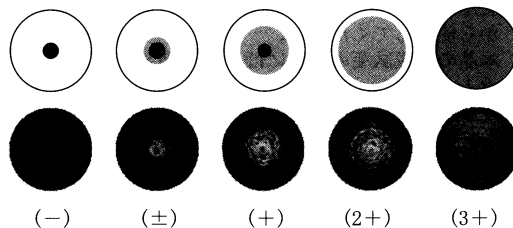
- (1) マイクロプレートを図のように使用します。
- (2) 1試料につき、マイクロプレート3系列にドロップャーを用いて、8ウェルまですべてのウェルに希釈液を25μLずつ滴加します。
- (3) 対照ペロトキシン用として2系列にドロップャーを用いて、8ウェルまですべてのウェルに希釈液を25μLずつ滴加します。
- (4) 同一試料を3本のダイリューターに吸い上げ、最後のウェルを除いて2倍階段希釈をします(最後のウェルは各ラテックス試薬の陰性対照となります)。
- (5) 同様に対照ペロトキシン1型及び2型はそれぞれ1系列ずつ2倍階段希釈をします。
- (6) 希釈系列の1列目には感作ラテックスVT1、2列目には感作ラテックスVT2を、また、3列目には対照ラテックスをそれぞれ25μLずつ滴加します。
- (7) 対照ペロトキシン1型の希釈系列には感作ラテックスVT1を、対照ペロトキシン2型の希釈系列には感作ラテックスVT2をそれぞれ25μLずつ滴加します。
- (8) マイクロプレート用ミキサーで十分振盪し、試料とラテックス試薬を混和します。

- (9) 反応液の蒸発を防ぐため、マイクロプレートをカバーするか又は湿潤箱に入れ、室温(1～30℃)に16時間以上静置後、判定します。(マイクロプレートをカバーして静置する場合、静電気の影響を防ぐため濡らした紙(ティッシュペーパーなど)の上に置くなどの処置をしてください。また、シールをした場合はラテックスの沈降に時間がかかる傾向があります。判定時にはラテックスが完全に沈降していることを必ず確認してください。)
- (10) 結果の判定は、明るい平坦な場所に黒紙を敷き、その上にマイクロプレートを置いて上方から各ウェルのラテックス沈降像を観察します。

【測定結果の判定法】*

ラテックス沈降像の判定は次の写真を参考に、(+)以上を凝集とします。

判定像



最初に、各ラテックス試薬の陰性対照(8番目)のウェルが(-)であることを確認します。

対照ラテックスに凝集が認められない場合	感作ラテックスに凝集が認められる場合	凝集を示す最高希釈倍数を凝集価とし、1:4以上の凝集価の場合は陽性と判定します。凝集価1:2の場合は判定保留とします。
	感作ラテックスに凝集が認められない場合	凝集価<1:2とし、陰性と判定します。
対照ラテックスに凝集が認められる場合	判定保留とします。ただし、感作ラテックスの凝集を示す最高希釈倍数が、対照ラテックスより4倍(2ウェル)以上高い場合は、陽性と判定し、感作ラテックスの凝集を示す最高希釈倍数を凝集価とします。	

「判定上の注意」

1. 操作法の逆受身ラテックス凝集反応試験の方法に従って各対照ペロトキシンと対応する感作ラテックスとを反応させ、試薬及び凝集像の確認を行ってください。
2. 陰性対照(8番目)のウェルにおいて凝集が認められた場合は、そのラテックス試薬は自然凝集を起こしているので使用しないでください。
3. 凝集価が1:128以上となる試料は、必要に応じて希釈液で100倍に希釈して再試験し、得られた凝集価に希釈倍数を乗じて算出します。
4. 判定保留となった場合はVero細胞致死試験、又はPCR法などの方法で試験を行ってください。
5. 反応時間は定められた時間で行ってください。また、操作開始後は、速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定となるように操作してください。
6. ペロトキシンには、アミノ酸配列の一部異なった変異型(VT variant)があることが知られています⁴⁾。本品のVT variantに対する検出感度は通常のペロトキシンより低く、VT2cで17.5ng/mLと報告されています⁵⁾。また、豚の浮腫病から分離される大腸菌の産生するVT2e⁴⁾に対する陽性一致率は50%(VT2e単独産生性大腸菌8株中4株が感作ラテックスVT2で陽性、4株が偽陰性)であったとの報告があります⁶⁾。VT variantを産生する大腸菌では偽陰性を生じる可能性がありますので注意してください。
7. 高度にペロトキシンを産生する株を試験した場合には、低希釈倍数のウェルで凝集を起こさないプロゾーン現象が観察される可能性があります。この場合でも高希釈倍数では凝集が観察されますので陰性との区別は容易です。

8. ベロトキシン産生が極めて低い株では、本品の検出感度までベロトキシンが産生されず、陽性との判定が得られない場合があります。分離株において、静置培養法で1:2の凝集価を示し判定保留となり、振盪培養法で陰性と判定された株の存在が確認されました。

【性能】

1. 感度

精製ベロトキシン1型及び精製ベロトキシン2型を0.5w/v%ウシ血清アルブミン加リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で100ng/mLとしました。この25μLを逆受身ラテックス凝集反应用試料として操作したとき対応する感作ラテックスは1:64から1:128の凝集価を示しました。

2. 正確性

下記の正確性試験用菌株をCAYE培地で37℃、16~20時間培養し、その遠心上清の25μLを逆受身ラテックス凝集反应用試料として操作するとき、対応するベロトキシンを産生する株のみが陽性を示し、他の菌株は陰性を示しました。

正確性試験用菌株

ベロトキシン産生大腸菌株

菌株 No.	産生ベロトキシン (VT型)	菌株 No.	産生ベロトキシン (VT型)
DK-EC-PS 1	VT1	DK-EC-PS 5	VT1, VT2
DK-EC-PS 2	VT1	DK-EC-PS 6	VT1, VT2
DK-EC-PS 3	VT2	DK-EC-PS 7	VT1, VT2
DK-EC-PS 4	VT2	DK-EC-PS 8	VT1, VT2

ベロトキシン非産生大腸菌株

菌株 No.	菌株 No.
DK-EC-NS 1	DK-EC-NS 7
DK-EC-NS 2	DK-EC-NS 8
DK-EC-NS 3	DK-EC-NS 9
DK-EC-NS 4	DK-EC-NS 10
DK-EC-NS 5	DK-EC-NS 11
DK-EC-NS 6	DK-EC-NS 12

3. 同時再現性

精製ベロトキシン1型及び精製ベロトキシン2型を0.5w/v%ウシ血清アルブミン加リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液で100ng/mLとしました。この25μLを逆受身ラテックス凝集反应用試料として5回同時に操作したとき対応する感作ラテックスはすべて1:64から1:128の凝集価を示しました。

4. 評価成績

動物由来158株の大腸菌を用いた評価⁶⁾の結果、PCR法及びVero細胞致死試験を対照としたベロトックスF「生研」の相関は次のとおりでした。

PCR法との相関

VT1の検出

	PCR法による VT1 遺伝子検出			
	陽性	陰性	計	
ベロトックスF「生研」による VT1 検出 ^{*3}	陽性	23	0	23
	陰性	0	135	135
	計	23	135	158

陽性一致率：100%
陰性一致率：100%
一致率：100%
陽性的中率：100%
陰性的中率：100%

VT2の検出

	PCR法による VT2 遺伝子検出				
	陽性	陰性		計	
		VT2	VT2e		
ベロトックスF「生研」による VT2 検出 ^{*3}	陽性	55	4 ^{*4}	0	59
	陰性	0	4 ^{*4}	95	99
	計	55	8	95	158

陽性一致率：93.7%
陰性一致率：100%
一致率：97.5%
陽性的中率：100%
陰性的中率：96.0%

Vero細胞致死試験との相関

	Vero細胞致死試験 ^{*5}			
	陽性	陰性	計	
ベロトックスF「生研」による検出 ^{*3}	陽性	75	0	75
	陰性	4 ^{*4}	79	83
	計	79	79	158

陽性一致率：94.9%
陰性一致率：100%
一致率：97.5%
陽性的中率：100%
陰性的中率：95.2%

数字は菌株数を示します。

*3：静置培養法、振盪培養法の判定は一致しました。

*4：VT2e単独産生株⁴⁾

*5：東京都立衛生研究所継代Vero細胞による試験。

試験対象菌株の内訳

VT1単独産生株：16株、VT2単独産生株：48株、

VT2e単独産生株：8株、

VT1・VT2両産生株：7株、VT非産生株：79株

【使用上又は取扱い上の注意】*

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 本品で試験を行う被検菌は腸管出血性大腸菌(四種病原体等)の可能性があります。本品でベロ毒素産生陽性と判定され、腸管出血性大腸菌であると確定された場合、取扱いにあたっては四種病原体等の取扱い基準に従ってください。また、ベロ毒素そのもの(菌体を含まない培養液など)も同じく規制対象となります。
- 本品は感染性の検体を対象としていますので、検体の採取、キットの操作、試料及び器具の廃棄の各場面において感染の危険のあるものとして取扱い、保護具(眼鏡、手袋、マスク等)を着用の上、十分注意して操作してください。なお、腸管出血性大腸菌はバイオセーフティレベル(BSL)2の病原体に該当します。
- 試薬が誤って皮膚に付着したり、目や口に入った場合には水で十分に洗い流す等の処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- ラテックス試薬は使用の直前に振盪攪拌して均一な懸濁液としてから使用してください。
- マイクロプレートは必ずキズ、汚れのないものを使用してください。
- 本品は凍結をさけ、貯法に従い保存してください。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ください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 試薬のキャップは取り違えないようにしてください。
- 検体を加えるとき、ウェルの壁に付着させないでください。
- プレートのウェルは強くこすらないでください。
- 検体相互間の汚染を防ぐため、検体をサンプリングする際、同一チップの使用は避けてください。
- 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせたり、混ぜ合わせて使用しないでください。また、同一ロットの試薬であっても試薬間の注ぎ足しは測定誤差を生じる原因となりますので避けてください。

3. 廃棄上の注意

- 検体中には感染性物質が存在する可能性がありますので、廃液、使用済み器具などは、次のいずれかの方法で滅菌処理を行ってください。
 - 最終濃度3.5vol%グルタルアルデヒド溶液に、30分間以上浸漬する。
 - 0.5w/v%次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素5000ppm)に1時間以上浸漬する。
 - 121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌をする。
- 本品の構成試薬の一部には保存剤としてアジ化ナトリウムが0.08w/v%含まれています。アジ化ナトリウムは鉛管、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ください。

感作ラテックスVT1	0.08w/v%
感作ラテックスVT2	0.08w/v%
対照ラテックス	0.08w/v%
希釈液	0.08w/v%
- 試薬及び器具等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、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】*

貯蔵方法 遮光して2~10℃に保存
有効期間 1年
(外箱に表示の使用期限内にご使用ください。)

【包装単位】*

ペロトックスーフ「生研」 20回用 (商品番号 230485)

◎当社別売品として次の製品も用意してありますので、ご利用ください。

大腸菌ペロトキシン検出試験用 CAYE培地「生研」	400mL	1本
	(商品番号 230560)	
BHI寒天培地「生研」	20枚入	1箱
	(商品番号 230577)	
ポリミキシンB溶液「生研」	20本入	1箱
	(商品番号 230584)	
96ウェルマイクロプレート(V)	10枚入	1箱
	(商品番号 230591)	

【主要文献】

- 厚生省監修:腸管病原性大腸菌, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版, 日本公衆衛生協会, D-30(1987).
- Adrienne, W.P., et al.: *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. J.Clin. Microbiol., **34**, 464(1996).
- Herbert, S., et al.: Shiga-like toxin II-related cytotoxin in *Citrobacter freundii* strains from human and beef samples. Infec. Immun., **61**, 534(1993).
- Marques LRM., et al.: *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema diseases produce a variant of shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett., **44**, 33(1987).
- Karmali, M. A., et al.: Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F Assay) for detection and characterizing verotoxins (shiga toxins) in *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., **37**, 396(1999).
- 甲斐明美ら: ラテックス凝集反応法によるVero毒素産生性大腸菌の同定: 大腸菌ペロトキシン検出用試薬の評価, 感染症誌, **71**, 248(1997).

【問い合わせ先】*

デンカ生研株式会社 学術営業推進部
〒103-8338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
TEL: 03-6214-3231(代表) FAX: 03-6214-3241

*1: BHI(Brain Heart Infusion)寒天培地の組成

仔ウシ脳浸出物	原料	200 g	相当
ウシ心臓浸出物	原料	250 g	相当
ペプトン		10 g	
ブドウ糖		2 g	
塩化ナトリウム		5 g	
リン酸水素二ナトリウム・12水		2.5 g	
寒天		15 g	
精製水		1 000 mL	
pH		7.4	

*2: CAYE(Casamino Acid Yeast Extract)培地の組成

カザミノ酸	20 g
酵母エキス	6 g
塩化ナトリウム	2.5 g
リン酸水素二ナトリウム	8.71 g
塩類溶液*	1 mL
精製水	1 000 mL
pH	8.5

*6: 塩類溶液の組成

硫酸マグネシウム	5 w/v%
塩化マンガン	0.5 w/v%
塩化第二鉄	0.5 w/v%

上記試薬を 0.5mmol/L硫酸水溶液に溶解したものです。

製造販売元



デンカ生研株式会社
新潟県五泉市南本町一丁目2番2号