

スライドラテックス凝集反応法による大腸菌 O111 鑑別試薬

E. coli O111-F 「生研」

【全般的な注意】

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。また、抽出試薬には刺激性を有するものがあります。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（液剤） | 2mL | 1本 |
| 抗大腸菌 O111 ウサギポリクローナル抗体感作ラテックス | | |
| 2. 対照ラテックス（液剤） | 2mL | 1本 |
| 3. 陽性コントロール（液剤） | 1mL | 1本 |
| 4. 抽出試薬 1（液剤） | 5mL | 1本 |
| 5. 抽出試薬 2（液剤） | 5mL | 1本 |
| 6. 抽出試薬 3（液剤） | 5mL | 1本 |

添付品

綿棒	60本
サンプルカップ	55個
スライド凝集反応板	30枚

【使用目的】

食品由来の大腸菌O111の検出

【測定原理】

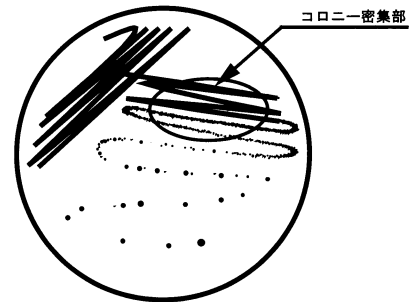
大腸菌 O111 に対する特異ポリクローナル抗体を感作したラテックス粒子は、検体中の大腸菌 O111 と反応して凝集を起こします。本品はこの抗原抗体反応を利用したスライドラテックス凝集反応法を測定原理としています。

【操作上の注意】

測定試料の性質、採取法

1. 食品から大腸菌分離用培地で選択・増殖したコロニー又はコロニー密集部を検体とします。
2. コロニー密集部からの検体採取は、図を参考に行ってください。
3. 検体採取には必ずキット添付の綿棒を使用してください。
4. 抽出液を保存する場合は、乾燥を避け冷蔵庫(2~10℃)に保存してください。

図.



【用法・用量（操作方法）】

1. 準備する器具及び試薬
 - 1) *E. coli* O111-F 「生研」
 - 2) マイクロピペット及びチップ(25 μ L, 100 μ L)
 - 3) 白金線
2. 試薬の調製

すべての試薬はそのまま使用します。

3. 操作法

本品は、亜硝酸抽出法によって検体を処理した後にスライドラテックス凝集反応で調べる抽出法を基本としますが、個別のコロニーを調べる場合には亜硝酸抽出法を省略した直接法も可能です。ただし、直接法で対照ラテックスに凝集が見られる場合は、抽出法で確認を行ってください。

A：培養検体からの検出

1) 抽出法

大腸菌分離用培地上の個別コロニー又はコロニー密集部を検体とします。

(抽出の際は十分攪拌してください。不十分な場合は偽陽性又は偽陰性を生じる可能性があります。)

- (1) 分離培地上のコロニー密集部からマッチ棒の頭程度の検体を添付の綿棒で採取します。個別のコロニーの場合は、1個のコロニーを添付の綿棒で採取します。
- (2) 綿棒をサンプルカップに立て、抽出試薬1を2滴滴加します。
- (3) 抽出試薬2を2滴滴加した後、綿棒をサンプルカップの壁に押しつけるように回しながら十分に攪拌し、5分間静置します。
- (4) 抽出試薬3を2滴滴加し、(3)と同様に十分に攪拌します。
- (5) 攪拌後、綿棒をサンプルカップの壁に押し付け綿棒内部の液を絞り出すようにして集め、試料とします。
- (6) スライド凝集反応板の縁を折り立てます。
- (7) スライド凝集反応板の2つのサークルに試料を25 μ Lずつ滴加し、チップでサークル全体に広げます。
- (8) 2つのサークルの一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを1滴それぞれに滴加します。
- (9) スライド凝集反応板を前後左右に2分間揺動かし、反応を行います。
- (10) 反応終了後すぐに十分な光量下でラテックスの凝集を肉眼で観察します。

- (11)陽性コントロールの1滴ずつを感作ラテックスと対照ラテックスにそれぞれ反応させて試薬及び凝集像を確認します。

2)直接法

大腸菌分離用培地上の個別コロニーを検体とします。

- (1)スライド凝集反応板の縁を折り立てます。
- (2)2つのサークルの一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを1滴それぞれに滴加します。
- (3)検体を白金線に取り、それぞれのサークルに均一に加えます。
- (4)白金線を用いて対照ラテックスと検体が均一となるように混和しながらサークル全体に広げます。次いで、感作ラテックスも同様に混和します。
- (5)スライド凝集反応板を前後左右に2分間揺り動かし、反応を行います。
- (6)反応終了後すぐに十分な光量下でラテックスの凝集を肉眼で観察します。
- (7)陽性コントロールの1滴ずつを感作ラテックスと対照ラテックスにそれぞれ反応させて試薬及び凝集像を確認します。

【測定結果の判定法】

判定は以下の基準に従って行います。

黒い背景に強い凝集塊が観察されるもの	3+
わずかに白色を帯びた背景に凝集塊が観察されるもの	2+
乳白色の背景に明らかなラテックス粒子の凝集塊が観察されるもの	1+
均一な乳濁を示し、凝集塊が観察されないもの	—

1+以上を凝集とします。

最初に対照ラテックスが凝集していないことを確認します。

判 定 像	判 定
感作ラテックスに凝集が認められるもの	陽 性
感作ラテックスに凝集が認められないもの	陰 性
対照ラテックスに凝集が認められるもの	判定保留

「判定上の注意」

1. スライドラテックス凝集反応の反応時間は必ず2分間としてください。反応時間を延長した場合は非特異反応が現れることがあります。
2. 直接法で対照ラテックスに凝集が観察され判定保留とされた場合、抽出法で再試験してください。また、抽出法で判定保留とされた場合は、検体の生理食塩液浮遊液(マッチ棒の頭3つ分を0.5mLに浮遊したもの)を100℃、10分間以上加熱処理して再試験してください。
3. コロニー密集部を試験して陽性となった場合、大腸菌O111を分離して確認する必要があります。
4. コロニー密集部を試験したとき、検体中に存在する大腸菌O111が検出感度以下の場合には陰性と判定されます。本法による陰性との成績は大腸菌O111の存在を直ちに否定するものではありません。
5. 大腸菌O111であってもペロ毒素を産生しない株は腸管出血性大腸菌とは扱いません。腸管出血性大腸菌との最終判定にはペロ毒素の検出が必要です。¹⁾
6. 本品は大腸菌O111を検出するものですが、大腸菌以外にもO111と交差性のある抗原を持つ細菌が存在した場合には陽性との判定となります。従って大腸菌O111との最終判定には生化学的性状による同定が必要です。
7. 腸管出血性大腸菌にはO111以外にも多くの血清型が存在することが知られています。O111以外の血清型の大腸菌は本品で陰性と判定されます。

【性能】

1. 感度

大腸菌 O111 DK-EC-LA6 株を加熱不活化後、 2×10^8 個/mL となるように生理食塩液に浮遊した後、生理食塩液で3倍希釈系列を調製しました。各希釈系列の25 μ Lをスライドラテックス凝集反应用試料として操作したとき感作ラテックスは1:3³まで凝集を示しました。

2. 特異性

下記の特異性試験用菌株を Heart Infusion 寒天培地で37℃、16~20時間培養し、その培養菌体をスライドラテックス凝集反应用試料として操作するとき、大腸菌O111株のみが陽性を示し、他の菌株は陰性を示しました。

特異性試験用菌株

菌株 No.	菌種・血清型	備 考
陽性株		
DK-EC-LA 6	<i>E. coli</i> O111:H-	VT1, VT2 産生株
DK-EC-LA 12	<i>E. coli</i> O111:H-	
DK-EC-LA 13	<i>E. coli</i> O111:H-	VT1, VT2 産生株
DK-EC-LA 14	<i>E. coli</i> O111:H-	VT2 産生株
陰性株		
DK-EC-LA 1	<i>E. coli</i> O157:H7	VT2 産生株
DK-EC-LA 5	<i>E. coli</i> O26:H-	VT1 産生株
DK-EC-LA 7	<i>E. coli</i> O1:H-	
DK-EC-LA 8	<i>Klebsiella</i> type 1	

3. 同時再現性

大腸菌 O111 DK-EC-LA 6 株を加熱不活化後、 2×10^8 個/mL となるように生理食塩液に浮遊した後、生理食塩液で3倍希釈系列を調製しました。各希釈系列の25 μ Lをスライド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、感作ラテックスはすべて1:3³まで凝集を示しました。

4. 混合菌からの検出

大腸菌 O111 と他の大腸菌を混合して抽出法で試験したとき、O111の比率が1:100まで陽性と判定されました。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 1)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。腸管出血性大腸菌の確定には、ペロ毒素の産生または遺伝子の確認等、追加試験が必要です。なお、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。
- 2)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、十分注意をして操作してください。なお、大腸菌はバイオセーフティレベル(BSL)2に該当します。

2. 使用上の注意

- 1)本品は凍結をさけ、貯法(2~10℃)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。また、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。
- 2)ラテックス試薬及び陽性コントロールは、使用の直前に十分攪拌して、均一な懸濁液とし、瓶を垂直に立てて滴加してください。

- 3) 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。
- 4) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 5) スライド凝集反応板は点線部を折り立てて使用してください。
- 6) 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。
- 7) 各試薬のキャップは取り違えないようにしてください。
- 8) 本品は記載された操作法に従って使用してください。
- 9) 試薬の滴加はノズルの先端をティッシュペーパー等で拭いてから、瓶を垂直に立てて行ってください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 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。
 - (1) 最終濃度3.5vol%グルタルアルデヒド溶液に、30分以上浸漬する。
 - (2) 0.5w/v%次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素5 000ppm)に、1時間以上浸漬する。
 - (3) 121℃で20 分間以上高圧蒸気滅菌をする。
- 2) 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	0.08w/v%
対照ラテックス	0.08w/v%
陽性コントロール	0.08w/v%
- 3) 抽出試薬1は、10vol%酢酸溶液です。廃棄の際は多量の水と共に流してください。
- 4) 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】

E. coli O111-F「生研」 50 回用 (商品番号 230683)

【主要文献】

- 1) 坂崎利一ら： *Escherichia* 属、腸内細菌 <下巻>、第3版、近代出版、75 (1992)。

【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

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