

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による食品中
ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット

エンテロトックス-F 「生研」

【一般的な注意】

1. 本品は、食品検査用試薬であり、食品検体又は食品由来の黄色ブドウ球菌の検査にのみ使用してください。
2. 添付文書に記載された操作法に従って使用してください。記載された操作法及び使用目的以外での使用については、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. 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. 感作ラテックス抗A 5 mL × 1本
ブドウ球菌エンテロトキシンA抗体(ウサギ)感作ラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
2. 感作ラテックス抗B 5 mL × 1本
ブドウ球菌エンテロトキシンB抗体(ウサギ)感作ラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
3. 感作ラテックス抗C 5 mL × 1本
ブドウ球菌エンテロトキシンC抗体(ウサギ)感作ラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
4. 感作ラテックス抗D 5 mL × 1本
ブドウ球菌エンテロトキシンD抗体(ウサギ)感作ラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
5. 感作ラテックス抗E 5 mL × 1本
ブドウ球菌エンテロトキシンE抗体(ウサギ)感作ラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
6. 対照ラテックス 5 mL × 1本
正常ウサギIgGを感作したラテックス浮遊液で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。
7. 対照エンテロトキシンA(凍結乾燥) 0.5 mL分 × 1本
凝集価は、瓶ラベルに表示してあります。
8. 対照エンテロトキシンB(凍結乾燥) 0.5 mL分 × 1本
凝集価は、瓶ラベルに表示してあります。
9. 対照エンテロトキシンC(凍結乾燥) 0.5 mL分 × 1本
凝集価は、瓶ラベルに表示してあります。
10. 対照エンテロトキシンD(凍結乾燥) 0.5 mL分 × 1本
凝集価は、瓶ラベルに表示してあります。
11. 対照エンテロトキシンE(凍結乾燥) 0.5 mL分 × 1本
凝集価は、瓶ラベルに表示してあります。
12. 希釈液 50 mL × 3本
ウシ血清アルブミンを0.5w/v%含むリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(PBS)で、保存剤としてアジ化ナトリウムを0.08w/v%含みます。

【使用目的】

食品中及び食品から分離したブドウ球菌のエンテロトキシンの検出^{2) 3) 4)}

【測定原理】

ブドウ球菌エンテ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、試料中のエンテロトキシンと特異的に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】

1. 測定試料の性質、採取法
 - 1) 食品を検体とする場合は、後述の対象とする食品ごとの調製法に従ってください。
 - 2) 菌株を検体とする場合は、「厚生省監修 微生物検査必携」¹⁾等の方法に従って分離され、生化学的性状試験によってブドウ球菌と同定された菌株を使用してください。
2. その他
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。

【用法・用量(操作方法)】

1. 準備する器具及び試薬、培地
 - 1) 96ウェルマイクロプレート(V)
 - 2) 小試験管
 - 3) マイクロピペット及びチップ(20~200 µL)
 - 4) マイクロプレート用ミキサー
 - 5) マイクロプレート用遠心機(RMAT法適用時)
 - 6) ホモジナイザー
 - 7) 微量pHメーター(pH修正必要な検体時)
 - 8) その他(プレートカバー、マーキング用テープ、湿潤箱、沈降線観察装置)
 - 9) 遠心分離機(900×g以上:卓上型遠心機で約3 000rpm以上)
 - 10) 生理食塩液
 - 11) フリーゲンII(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)
 - 12) 塩酸
 - 13) 水酸化ナトリウム
 - 14) 0.25 mol/L EDTA・2Na(Ethylene diamine tetra acetic acid, disodium salt)
2. 試薬及び検体の調製方法
 - 1) 試薬の調製
 - (1) 本品
各感作ラテックス及び対照ラテックスは、穏やかに攪拌し均一にします。
希釈液は、そのまま使用します。
対照エンテロトキシンは、希釈液0.5 mLを加えて完全に溶解します。使用時に希釈液でさらに16倍に希釈します。
 - (2) 生理食塩液
精製水100 mLに対し0.85 gのNaClを加え溶解します。
 - (3) 塩酸
精製水で適当な濃度に調製します。(検体に対し1/20量以下になるような濃度が望ましい。牛乳の場合1.5 mol/L程度)

- (4) 水酸化ナトリウム
精製水で適当な濃度に調製します。(検体に対し1/20量以下になるような濃度が望ましい。牛乳の場合1.5 mol/L程度)
- (5) 0.25 mol/L EDTA・2Na(非特異除去剤)
精製水1 Lに対し93.06 gのEDTA・2Naを加え溶解します。

2) 検体の調製

(1) 食品検体の調製

a. 標準的抽出法

食品検体1 gに対し9 mLの生理食塩液を加えホモジナイズします。
ホモジナイズ後、3 000rpm, 20分間遠心し、得られた遠心上清を試験試料とします。

b. 水溶性蛋白質や脂質の含有量が多い検体の処理法

b-1. 牛乳・脱脂粉乳溶液など

検体2 mLを塩酸でpH3.8に調整後、3 000rpm, 15分間遠心分離します。

遠心上清を回収し水酸化ナトリウムでpH7.0に調整後、1/2量のフリーゼンIIを添加し、よく攪拌します。その後3 000rpm, 15分間遠心分離し遠心上清を回収し1/20量の0.25 mol/L EDTA・2Naを添加し試験試料とします。(牛乳の種類によっては通常のRPLA法では正常な陽性像を形成しないことがありますので後述のRMAT法あるいは変法RPLA法で測定してください。)

b-2. バター

検体1 gに対し等量の生理食塩液を加え、約45°Cで溶解し混和します。

更に等量のフリーゼンIIを添加し、よく攪拌します。その後3 000rpm, 15分間遠心分離し遠心上清を回収し、必要に応じてpH7.0に調整後、1/20量の0.25 mol/L EDTA・2Naを添加し試験試料とします。

b-3. チーズ

検体1 gに対し9 mLの生理食塩液を加え、ホモジナイズします。1/2液量のフリーゼンIIを添加し、よく攪拌後、3 000rpm, 15分間遠心分離し遠心上清を回収します。回収した上清を塩酸でpH3.8に調整後、3 000rpm, 15分間遠心分離し、遠心上清を回収します。回収した上清を水酸化ナトリウムでpH7.0に調整後、1/20量の0.25 mol/L EDTA・2Naを添加し試験試料とします。

b-4. 卵焼き・畜肉製品(ハム・挽肉・鶏肉・ミートソース(レトルト))

検体1 gに対し9 mLの生理食塩液を加えホモジナイズします。1/2液量のフリーゼンIIを添加し、よく攪拌後、3 000rpm, 15分間遠心分離し、遠心上清を回収します。回収した上清のpHが中性であることを確認し試験試料とします。

(2) ブドウ球菌培養液検体の調製

食品より単離した黄色ブドウ球菌をHeart infusion (HI)等の液体培地に接種し、37°Cで18~20時間、振盪培養します。

培養後、培養液を3 000rpm, 20分間遠心分離して得られた遠心上清を試験試料とします。

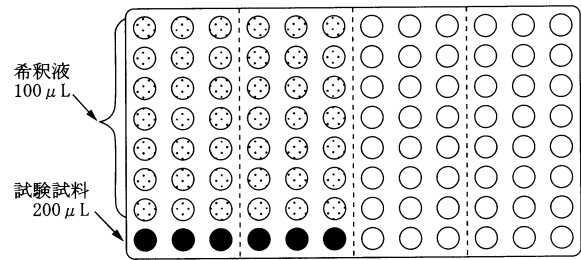
3. 操作法

1) 食品検体

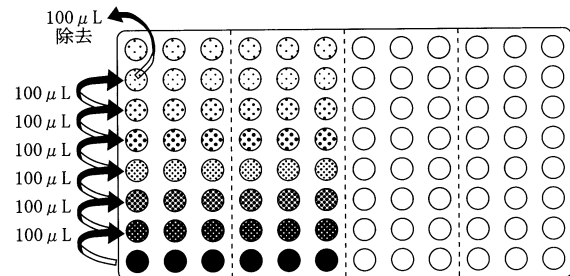
本品では食品検体や分離菌の培養上清のエンテロトキシン検出は、基本的にRPLA法(下記(1))によって行います。しかし、牛乳など一部の食品では判定方法を変更した変法RPLA法(下記(2))で試験を行う必要があります。また、迅速検査に適した方法としてRMAT法(下記(3))も用いることができます。RMAT法は、判定まで約30分間と短時間で行うことができます。

(1) RPLA法

1検体につきマイクロプレートを横に6列使用します。マイクロピペットを用いて1番手前のウェルに試験試料200 μLを加え、2~8番目のウェルに希釈液100 μLを加えます。

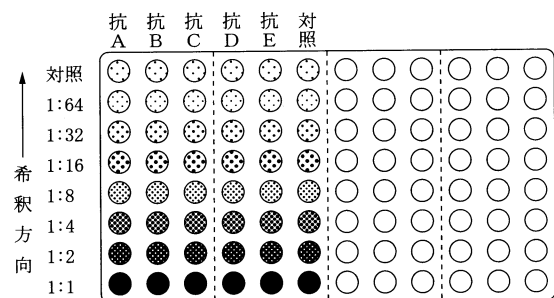


マイクロピペットを用いて1番手前のウェルの試験試料100 μLを2番目のウェルに添加し混和します。次に、2番目のウェルの100 μLを3番目のウェルに添加し混和します。この操作を7番目のウェルまで行い、2倍階段希釈で64倍まで希釈系列を作製します。(最上段は対照のため希釈はしません。)



それぞれの列に各感作ラテックス(抗A, B, C, D, E及び対照ラテックスを1滴(25 μL)ずつ滴加し、マイクロプレート用ミキサーで十分混和します。

各感作ラテックス 1滴(25 μL)

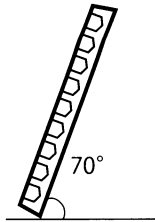


反応液の蒸発を防ぐため、マイクロプレートをカバーするか又は湿潤箱に入れ、室温に18~20時間以上静置後、判定します。

判定は、【測定結果の判定法】を参考に判定してください。

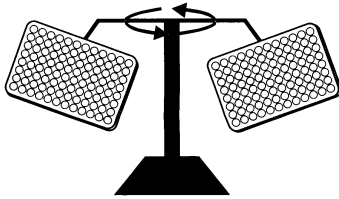
(2) 変法RPLA法

牛乳検体など一部の食品検体では、RPLA法で正常な陽性像を形成しない場合があります。その場合、本法を用いて判定してください。まず、RPLA法と同様な操作を行い、ラテックスの凝集を観察し、判定を行います。その後、マイクロプレート約70度に傾斜し、10分後にRPLA法で陰性となったウェルを観察します。陰性像に変化のない状態(凝集)を陽性とし、ラテックス粒子が流下するウェルを陰性とします。RPLA法あるいは変法RPLA法どちらか一方でも陽性と判定されたウェルを陽性と最終判定します。判定は、【測定結果の判定法】を参考に判定してください。



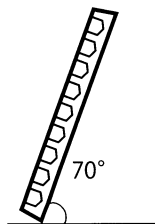
(3) RMAT法(Rapid Micro Agglutination Test)

RPLA法と同様にして感作ラテックス及び対照ラテックスを試験試料とマイクロプレート中で混和させます。混和後、静置せずにマイクロプレートをマイクロプレート用遠心機で遠心(2 000rpm, 20分間)し、ラテックス粒子をマイクロプレートウェル底に強制的に沈降させます。



遠心終了後、各ウェルの底中央にラテックス粒子が完全に沈降集合していることを確認し、プレートを約70度に傾け10分後にウェル底のラテックス粒子の状態を観察します。ラテックス粒子がウェル底中央にそのまま保持される状態(凝集)を陽性、流下する状態を陰性とします。

判定は、【測定結果の判定法】を参考に判定してください。



2) ブドウ球菌培養液検体

培養液検体については一般的に毒素濃度が高いためプロゾーン現象が起こりやすく、また、菌体から産生されたプロテインA様物質の濃度(≥50 ng/mL)によっては非特異反応⁵⁾⁶⁾が起こることがあります。そのため、試験管を用いて10倍階段希釈により10 000倍まで希釈します。希釈された試料を手前から横6ウェルに10倍、100倍、1 000倍のように100 μLずつ添加し、10 000倍の次は希釈液のみ100 μL添加して対照とします。以後はRPLA法と同様に各感作ラテックスを添加して反応させます。

3) 対照エンテロトキシン

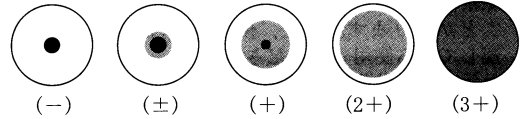
調製した各対照エンテロトキシンの100 μLをさらに希釈液を用いて16倍に希釈します。希釈後の各対照エンテロトキシンを試験試料と同様の操作により測定します。RPLA法での凝集価については瓶ラベルに表示したとおりです。(変法RPLA法又はRMAT法での凝集価は1管から2管上昇します。)

【測定結果の判定法】

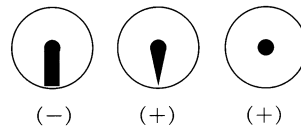
ラテックス沈降像の判定は次の模式図を参考に、(+)以上を凝集とします。

判定像

RPLA法



変法RPLA法及びRMAT法



(+)以上を陽性とします。

対照ラテックスが(+)以上の凝集を示した場合は、非特異凝集とみなします。一方、感作ラテックスと希釈液のみのウェルにおいて(+)以上の凝集を示した場合は、ラテックスが自然凝集を起こしているため、その試薬は使用しないでください。

「判定上の注意」

- 1. 各対照エンテロトキシンと対応する感作ラテックスを反応させ、試薬及び凝集像の確認を行ってください。
2. 最後ウェルのラテックスと希釈液との対照(+)以上の凝集が見られた場合は、ラテックスが自然凝集を起こしているため使用しないでください。

【性能】

1. 感度

管理用精製黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA, B, C, D及びE(各100 ng/mL)を本キットの測定操作に従いRPLA法とRMAT法で試験を行いました。RPLA法による感度はそれぞれ0.1 ng/mLとなり、RMAT法による感度はそれぞれ0.025 ng/mLとなりました。

2. 特異性

管理用精製黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA, B, C, D及びE(各100 ng/mL)を本キットの測定操作に従い全種類の感作ラテックスに対しRPLA法で試験を行いました。感作ラテックス抗Aは精製エンテロトキシンAのみに対し陽性を、それ以外の精製エンテロトキシンに対しては陰性を示しました。他の感作ラテックスも同様に相同する精製エンテロトキシンに対しては陽性を、相同しない精製エンテロトキシンに対してはすべて陰性を示しました。また、対照ラテックスはすべての精製エンテロトキシンに対して陰性を示しました。

3. 同時再現性

管理用精製黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA, B, C, D及びE(各100 ng/mL)を本キットの測定操作に従い全種類の感作ラテックスによるRPLA法で同時に5回測定するとき、相同する精製エンテロトキシンに対する凝集価はすべての成績において同一結果を示し、対照ラテックスはすべて陰性を示しました。

【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性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、黄色ブドウ球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。
- 2) 本品が、誤って目や口に入っ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

- 1) 本品は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。凍結させた場合、品質が変化して正しい成績が得られないことがあります。また、使用時には常温(15~25℃)に戻してから使用してください。
- 2) ラテックス試薬は使用時に十分振り混ぜ、均一な懸濁液としてから使用してください。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) プレートのウェルは強くこすらないでください。
- 6) 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。
- 7) 本品は、指定された条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
- 8) 試薬のキャップは取り違えないようにしてください。
- 9) 製造番号の異なる試薬を組み合わせて、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。
- 10) 食品検体によっては抗原抗体反応を阻害する物質を含有しており、記載の食品処理法では測定できないことがあります。
- 11) 溶解した対照エンテロトキシンは2~10℃に保存し、3箇月間以内に使用してください。

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、検体、廃液、使用済みの容器及び検査に使用したすべての器具類は、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分間以上浸漬する。
 - ②0.5w/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。
 - ③121℃で、20分間以上高圧蒸気滅菌をする。
- 2) 構成試薬中の感作ラテックス、対照ラテックス及び希釈液は、アジ化ナトリウムを0.08w/v%含んでいます。アジ化ナトリウムは、鉛や銅と反応して爆発性のある重金属アジ化物を生成することがありますので、大量の水とともに廃棄してください。
- 3) 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】

- 1) 貯蔵方法 2~10℃に保存
- 2) 有効期間 1年
(外箱、ラベルに表示の使用期限内にご使用ください。)

【包装単位】

コードNo.	品名	包装
230799	エンテロトックス-F「生研」	20回用

【主要文献】

- 1) 厚生省監修：経口感染症、ブドウ球菌、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-133(1987)。
- 2) Richard P. Mageau: USDA/FSIS Microbiology Laboratory Gidebook, 3rd ed., 15-1(1998)。

- 3) M. Akhtar: Determination of enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in food and broth media(The reversed passive latex agglutination (RPLA) method), MFLP-67, Polyscience Publications, April, (1998)。
- 4) 新垣正夫ら：ブドウ球菌エンテロトキシン検出法としての逆受身ラテックス凝集反応の検討、東京衛生年報、32, 128(1981)。
- 5) 小田隆弘ら：ラテックス凝集反応を用いたブドウ球菌エンテロトキシンの食品等からの検出、福岡市衛試報、4, 33(1979)。
- 6) 小田隆弘ら：SP-Sephadexクロマトグラフィーを用いたブドウ球菌エンテロトキシンA, B, C₂の簡易精製、日細誌、33, 743(1978)。

【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