[食品検査用試薬]　2024年5月作成（第1版）

NH イムノクロマトⅡVT1／２≪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。

[用途]

NHイムノクロマトⅡVT1/2は、食品検査室において様々な食品検体からのベロ毒素の定性的検出を目的としています。臨床目的での使用はできません。本キットは無菌操作技術に習熟した検査担当者による使用を想定しています。

[はじめに]

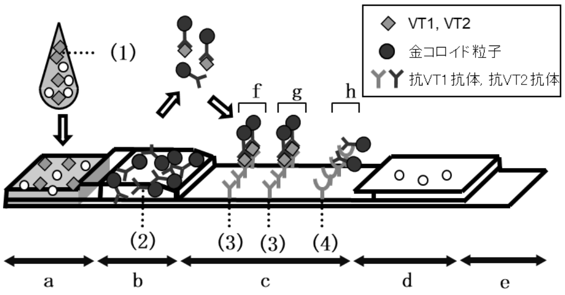
大規模な食中毒や死亡例が報告されている腸管出血性大腸菌は、これらが産生するベロ毒素（Verotoxin, VT）により症状を示します。このベロ毒素は抗原性の異なるベロ毒素1型（VT1）とベロ毒素2型（VT2）に大別され、非常に強力な毒性を有することが知られています。
日本国内ではO157、O26をはじめとして多数の血清型が検出されております。腸管出血性大腸菌は、ベロ毒素産生性の確認より確定されるため、腸管出血性大腸菌が検出された場合には、ベロ毒素の検査を行う必要があります。 本品は、イムノクロマト法を用いたベロ毒素検出キットで、簡単な操作で短時間にVT1およびVT2の検出と識別が可能です。

[キットの内容]

テストストリップ　1テスト・ 20袋（20 テスト）

[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



a.　試料滴下部(注1)
b.　試薬含有部
c.　展開部(注1)
d.　吸収パッド
e.　持ち手部
f.　VT1検出用テストゾーン（コントロールゾーンより約11mm）
g.　VT2検出用テストゾーン（コントロールゾーンより約7mm）
h.　コントロールゾーン

注1：　試料滴下部(a)や展開部(c)に手で触れたり傷をつけたりしないようにしてください。

2）検出原理

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、試料溶液中のベロ毒素（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、テストゾーンに固定化された抗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（テストライン）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。
コントロールゾーン（4）には金コロイド標識抗VT1抗体および金コロイド標識抗VT2抗体が捕捉されるため試料溶液中のベロ毒素の有無に関わらず赤紫色のライン（コントロールライン）が出現します。コントロールラインの出現により、試験が適切に実施されたことが確認できます。

[検出限界]

2.5 ng/mL～100 ng/mLのVT1、VT2を含む試料溶液は陽性と判定されることを確認しています（注2）。

注2：　本キットの最小検出感度は菌株、増菌培地の種類、および試料中の成分の影響により変動する場合があります。

[使用上の注意]

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ベロ毒素の濃度の影響により、偽陽性・偽陰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ベロ毒素は微量でも非常に強い毒性を示します。また、ベロ毒素産生株以外の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。

[試料溶液の調製1（分離コロニーからの検出）]

1）別途ご準備いただく試薬・器具等
1. インキュベーター
2. オートクレーブ
3. ディスポーザブルホールピペットまたはマイクロピペットおよびディスポーザブルチップ
4. 遠心分離機
5. 恒温水槽
6. CAYE培地
7. CAYEブイヨン添加剤
8. 腸管出血性大腸菌用分離培地
9. ポリミキシンB溶液（PBSに溶解）
10.その他、必要なもの

2）試料の調製（注3）
2)-1　腸管出血性大腸菌用分離培地を用いる場合
①　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。
②　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）、0.5 mg/mL（3000 unit/mL以上）ポリミキシンB溶液 1 mLに懸濁させてください。
③　懸濁液を37℃の恒温水槽中で30分間加温してください(注4)。
④　30分後、懸濁液を室温に戻し、試料溶液としてください(注6)。

2)-2 CAYE培地を用いる場合

① 被検コロニーをCAYE培地（添加剤を含む）1 mLに接種し、37℃、6～24時間培養してください(注5)。

② 培養後、終濃度0.5 mg/mL（3000 unit/mL以上）となるようにポリミキシンB溶液を加えてください。

③ 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(注4)。

④ 30分後、培養液を室温に戻し、試料溶液としてください(注5)。

注3: **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4: **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5: **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6: **培養液の残りは、本キット試験実施後の確定試験に使用す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（食品からの検出）]（注7）

1） 別途ご準備いただく試薬・器具等

1. ストマッカー袋（フィルター付を推奨）
2. ストマッカー
3. インキュベーター
4. オートクレーブ
5. ディスポーザブルホールピペットまたはマイクロピペットおよびディスポーザブルチップ
6. 遠心分離機
7. 恒温水槽
8. 増菌培地（ノボビオシン加mEC、mEC等）
9. ポリミキシンB溶液（PBSに溶解）
10. その他、必要なもの

2） 試料の調製(注8)

① 被検食品25 gをストマッカー袋に秤量して試料としてください。

② ストマッカー袋中の試料25 gに対して、増菌培地225 mLを加え、1分間ストマッカー処理を行ってください。

③ ストマッカー袋ごと、42℃で18～24時間培養してください(注10)。

④ 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。

⑤ 滅菌済みピペットを用いて、培養液1 mLを滅菌済み容器に分注してください（注11）。

⑥ 分注した培養液に対し、終濃度0.5 mg/mL（3000 units/mL以上）となるようにポリミキシンB溶液を加えてください。

⑦ 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（注9）。

⑧ 30分後、培養液を室温に戻し、試料溶液としてください(注10)。

注7: **本調製方法では増菌培養液中でベロ毒素が十分に産生されないと本キットで陰性となる可能性があります。**

注8: **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9: **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10: **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11: **培養液の残りは、本キット試験実施後の確定試験に使用す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

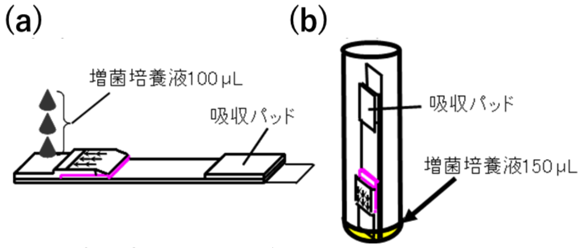
① テストストリップ包装は使用直前に開封してください。テストストリップ包装を冷蔵で保管していた場合には開封する前に室温に戻してから袋を開封してください(注12、注13)。

② 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（下図a）。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（下図b）。

③ 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。

(a) テストストリップを水平な台の上に置き、100 μLの試料溶液を未使用のピペットチップを用いて試料滴下部に滴下してください。滴下の際はテストストリップから溢れないよう注意し、必要に応じて2回に分けて滴下するなどしてください。

(b) 試料溶液150 μLを未使用のピペットチップを用いて試験管に分注してください。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試験管に挿入してください（注14）。



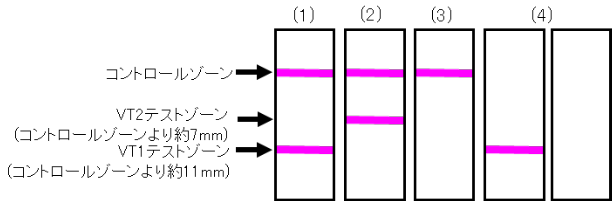
④ 試料溶液の滴下から15分後に結果を判定してください。

注 12: **テストストリップの吸湿を避けるため、テストストリップ包装を冷蔵で保存していた場合には、開封は室温に戻した後に行ってください。吸湿の影響により正しい試験結果が得られないことがあります。テストストリップ包装は使用直前に開封してください。**

注 13: **試料滴下部や展開部に傷をつけたり手で触れたりしないようにしてください。テストストリップを取り扱う際は吸収パッドあるいは持ち手部を持つようにしてください。**

注 14: **試料溶液の液面がテストストリップに印刷された矢印を越えないようにしてください。**

2） 結果の判定



(1) VT1陽性：試料溶液の滴下から15分後にVT1テストゾーンとコントロールゾーンに赤紫色のラインが観察されます。(注15、注16、注17)

(2) VT2陽性：試料溶液の滴下から15分後にVT2テストゾーンとコントロールゾーンに赤紫色のラインが観察されます。(注15、注16、注17)

(3) 陰性：コントロールゾーンにのみ、赤紫色のラインが観察されます。

(4) 再試験：コントロールゾーンに赤紫色のラインが認められない場合、結果は無効として再試験してください。

注 15: **本キットは[検出限界]に記載した濃度以上の VT1、VT2 が試料溶液中に存在する場合に陽性を示します。[試料溶液の調製1，2]に示す増菌培養の方法は検出感度以上の VT1，VT2 の産生を保証するものではありません。公定検査法[1)]等を参考に増菌培養を最適化してください。**

注 16: **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 17: **高濃度のVT1もしくはVT2が試料溶液中に存在する場合、VT1 テストゾーンおよびVT2 ゾーンの両方に赤紫色のラインが認められる可能性があります。**

[廃棄]

使用したテストストリップ、試験管、ピペットならびに増菌培養液は、各都道府県の条例に従ってオートクレーブ等により滅菌した後、廃棄してください。

[保存方法ならびに使用期限]

(1) 保存方法：直射日光をさけて 2～30℃で保存してください。テストストリップ包装を外装箱から出して保存する場合には遮光してください。多湿をさけてください。凍結はしないでください。

(2) 使用期限：外装箱ラベルおよびテストストリップ包装に記載

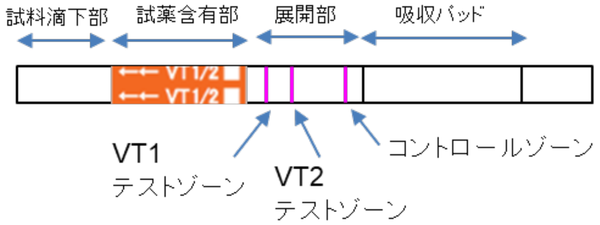
［保証について］

日本ハム株式会社は、明示または黙示を問わず、いかなる保証も致しかねます。製品に瑕疵があった場合には販売元もしくは日本ハム株式会社が代替品を提供致します。製品の廃止、および仕様変更は予告なく行う場合があります。各操作手順や、それぞれの食品検体への適用の妥当性については、お客様ご自身でご検証ください。日本ハム株式会社は、本製品の使用により直接的、あるいは間接的に生じたいかなる損害や費用についても責任を負いません。本製品により得られた結果の判断および利用は、お客様の責任のもと実施してください。

［参考文献］

1） 食安監発1120 第1号「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145 及びO157 の検査法について」

［問い合わせ先］

● 製造元
日本ハム株式会社　中央研究所
〒300-2646　茨城県つくば市緑ケ原3丁目3番地
電話：　029-847-7825
E-mail:　nh.kit@nipponham.co.jp
https://www.rdc.nipponham.co.jp

［判定イメージ］