

** ご使用の際は、電子化された添付文書をよくお読みください

細菌毒素検出キット

VET-RPLA「生研」

【一般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
- ** 3. 電子化された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。
- ** 4. 使用する機器の電子化された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。
5. 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。
6. 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) | 5mL | 1本 |
| コレラエンテロトキシン抗体 | | |
| 2. 対照ラテックス (液剤) | 5mL | 1本 |
| 3. 対照エンテロトキシン (凍結乾燥剤) | 0.5mL分 | 1本 |
| 凝集価は瓶ラベルに表示してあります。 | | |
| 4. 希釈液 (液剤) | 50mL | 1本 |

【使用目的】

コレラ菌、大腸菌の産生するエンテロトキシンの測定

【測定原理】

コレラ菌エンテロトキシン(CT)¹⁾²⁾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CT又は易熱性エンテロトキシン(LT)と特異的に反応して^{3)~7)}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. 検体は「厚生省監修 微生物検査必携」等の方法に従って分離され、生化学的性状試験等によってコレラ菌または大腸菌と同定された菌株を検体としてください。
2. 菌株は必ず純培養されたもの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判定できない可能性があります。

【用法・用量(操作方法)】

1. 準備する器具及び試薬
 - 1) ポリミキシンB
 - 2) 生理食塩液
 - 3) 毒素産生培地 (培地組成は最後尾に別記)
 - 4) 96ウェルマイクロプレート(V型)
 - 5) ドロップパー(25μL, 又は25μLマイクロピペット)
 - 6) ダイリューター(25μL, 又は25μLマイクロピペット)
 - 7) マイクロプレート用ミキサー
 - 8) その他(黒紙、プレートカバー、マーキングテープ、湿潤箱)
 - 9) 遠心分離機(900×g以上: 卓上遠心機で約3 000rpm以上)
2. 試薬の調製
感作ラテックス、対照ラテックス及び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0.5mLを加え溶解して使用します。溶解後の対照エンテロトキシンは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分以上放置してから使用してください。

3. 検体の調製

1) コレラ菌又は大腸菌培養液

被検菌株をコレラ菌毒素産生培地^{*1}(Finkelsteinら⁸⁾のSyncase培地が一般的に用いられます。)、大腸菌毒素産生培地^{*2}(Evansら⁹⁾のCA-YE培地が一般的に用いられます。)に接種し、コレラ菌のときは30℃で、また、大腸菌のときは37℃でそれぞれ18~20時間振盪培養(110回/分以上)します。培養後、培養液を3 000rpmで約20分間遠心し、上清を検体とします。(*1,*2培地組成は最後尾に別記)

2) 大腸菌菌体ポリミキシンB処理液¹⁰⁾

LT産生性の低い大腸菌は、培養上清中に、この方法で検出できる十分な毒素が含まれていないことがあります。そのような場合又は振盪培養ができない場合は、次のように菌体をポリミキシンBで処理した抽出液を検体とします。

(1) 被検菌株を約10mLのカンテン斜面培地(リンコマイシン90μg/mL¹⁰⁾添加ブレイン・ハート・インフュージョン培地、その他)に接種し、37℃で18~20時間培養します。

(2) 培養菌体を、5 000単位/mLのポリミキシンBを加えた生理食塩液1mLに浮遊します。

(3) 37℃で30分間振盪後、3 000rpmで20分間遠心します。

(4) 上清を注意深く採取し、検体とします。

4. 操作法(逆受身ラテックス凝集反応)

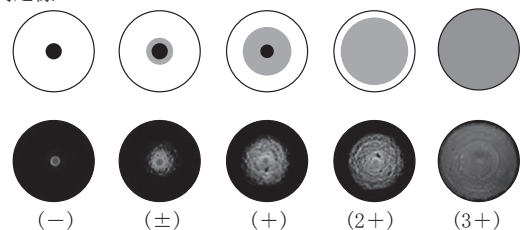
- 1) 1検体につき、マイクロプレート2系列にドロップパーを用いて、すべての穴に希釈液を25μLずつ滴加します。
- 2) 同一検体25μLを2本のダイリューターにそれぞれ吸いあげ、最後の穴を除いて2倍階段希釈をします。(最後の穴はラテックス試薬の陰性対照となります。)
- 3) 感作ラテックス及び対照ラテックスを、それぞれの系列に25μLずつ滴加します。
- 4) ラテックス沈降像及び試薬の確認は、検体のかわりに対照エンテロトキシンを用い、前記と同様の操作で行います。
- 5) マイクロプレート用ミキサーで十分振盪します。
- 6) マイクロプレートを室温に18~20時間静置後、判定します。この時、反応液の蒸発を防ぐために、プレートをカバーするか又は湿潤箱に入れます。

【測定結果の判定法】

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、上方から各穴のラテックス沈降像を目視で観察します。

ラテックス沈降像の判定は、次の写真を参考に行ってください。

判定像



感作ラテックスで(+)以上を陽性としします。

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。

「判定上の注意」

1. 【用法・用量(操作方法)】 4. 操作法に従って対照エンテロトキシンと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. 最後の穴のラテックスと希釈液との反応において(+)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ので使用しないでください。
3. 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。

【性能】

1. 感度
当社で調製した管理用精製コレラエンテロトキシン(100ng/mL)を用いて逆受身ラテックス凝集反応を行ったとき、感作ラテックスは、64～128倍の値を示します。
2. 正確性
管理用精製コレラエンテロトキシンに対してコレラエンテロトキシン抗体を用いて凝集阻止反応を行ったとき、凝集が3管以上阻止されます。
3. 同時再現性
上記感度試験及び正確性試験を3回以上行ったとき、上記と同一の成績を示します。
4. 最小検出感度
感作ラテックスの最小検出感度は1～2ng/mLです。

【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 *V. cholerae* はコレラ菌(四種病原体等)の可能性があり。血清型別試験により *V. cholerae* O1または *V. cholerae* O139と判定された被検菌が、本品によってコレラ毒素の産生が確認された場合、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) 本品は感染性の臨床検体を対象としていますので、検体の採取、キットの操作、検体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、毒素原性大腸菌及びコレラ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。
 - 3) 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
 - 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。
 - 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
 - 3) 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。
 - 4) 試薬のキャップは取り違えないようにしてください。
 - 5) 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。
 - 6) マイクロプレートのウェルは強くこすらないでください。
 - 7) 検体を加えると、ウェルの壁に付着させないでください。
 - 8) 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。
 - 9) 製造番号の異なる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、同一製造番号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
 - 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5000ppm)に、1時間以上浸漬する。
(3) 121℃で20分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%
希釈液	0.08w/v%

- 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】

貯蔵方法 2～10℃に保存
有効期間 1年

(ラベルに表示の使用期限内にご使用ください。)

【包装単位】

VET-RPLA「生研」 20回用 (商品番号 230010)

◎当社別売品として次の製品も用意しておりますので、ご利用ください。

VET-RPLA「生研」凝集阻止用抗体

凍結乾燥 5mL分 1本 (商品番号 230119)

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】

- 1) Sack, R.B., et al.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Severe Cholera-like Disease, J. Infect. Dis., 123, 378(1971).
- 2) Smith, H.W. & Gyles, C.L.: The Relationship Between Two Apparently Different Enterotoxins Produced by Enteropathogenic Strains of *Escherichia coli* of Porcine Origin, J. Med. Microbiol., 3, 387(1970).
- 3) Gyles, C.L. & Barnum, D.A.: A Heat-Labile Enterotoxin from Strains of *Escherichia coli* Enteropathogenic for Pigs, J. Infect. Dis., 120, 419(1969).
- 4) Gyles, C.L.: Immunological Study of the Heat-Labile Enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, Infect. Immun., 9, 564(1974).
- 5) Clements, J.D. & Finkelstein, R.A.: Immunological Cross-Reactivity Between a Heat-Labile Enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and Subunits of *Vibrio cholerae* Enterotoxin, Infect. Immun., 21, 1036(1978).
- 6) Clements, J.D. & Finkelstein, R.A.: Demonstration of Shared and Unique Immunological Determinants in Enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*, Infect. Immun., 22, 709(1978).
- 7) Kudoh, Y., et al.: Detection of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* by Reversed Passive Hemagglutination Test with Specific Immunoglobulin Against Cholera Toxin, Proceedings of the 14th Joint Conf., U. S.-Japan Coop. Med. Sci. Program, Cholera Panel, Toho Univ., Tokyo, 266(1979).
- 8) Finkelstein, R.A., et al.: Pathogenesis of Experimental Cholera: Biologic Activities of Purified Procholeragen A, J. Immunol., 96, 440(1966).
- 9) Evans, D.J., et al.: Production of Vascular Permeability Factor by Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Man, Infect. Immun., 8, 725(1973).
- 10) 日本細菌学会教育委員会編: 逆受身赤血球凝集反応(Reversed Passive Hemagglutination, RPHA)コレラ菌と毒素原性大腸菌の検査法, 菜根出版, 75(1981).

***【問い合わせ先】

デンカ株式会社 試薬学術担当

〒103-8338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号

フリーダイヤル 0120-206-072

受付時間 9:00～17:00 (土日祝日・弊社休業日を除く)

※1：コレラ菌毒素産生培地

カザミノ酸	10g
Na ₂ HPO ₄	5g
NH ₄ Cl	1.18g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.042g
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.005g
白糖	5g
K ₂ HPO ₄	5g
Na ₂ SO ₄	0.089g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.004g
蒸留水	1 000mL
p H	7.2

※2：大腸菌毒素産生培地

カザミノ酸	20g
NaCl	2.5g
塩類溶液 ^{*3}	1mL
酵母エキス	6g
K ₂ HPO ₄	8.71g
蒸留水	1 000mL
p H	8.5

※3：MgSO₄ 5%，MnCl₂ 0.5%，FeCl₃ 0.5%を
0.001N H₂SO₄に溶解したものです。

* 製造販売元

デンカ株式会社

新潟県五泉市木越字鏡田 1 3 5 9 番地 1