

2010年2月作成

# NHイムノクロマト VT1／2 説明資料



**Nippon Ham Group**

人輝く、食の未来

日本ハム株式会社

中央研究所

NHイムノクロマト VT1/2の検出対象であるベロ毒素(Verotoxin)は、O157をはじめとする腸管出血性大腸菌が産生する毒素で食中毒の原因物質。

ベロ毒素は、ベロ毒素1型(VT1)と2型(VT2)に分類される。

## <ベロ毒素検査の必要性>

- 腸管出血性大腸菌の確定は、ベロ毒素産生性確認により実施される。
- 通知法※では大腸菌O157、O26の分離に先立ち、ベロ毒素産生遺伝子によりスクリーニングを行うことが認められている。

※(「腸管出血性大腸菌O157及びO26の検査法について(平成18年11月2日付け食安監発第1102004号通知)」)

- 腸管出血性大腸菌は多種類あり、O抗原だけで130種類以上報告されている。

参考資料: 腸管出血性大腸菌感染症における血清型検出頻度

	症例数	O157	O26	O111	その他
2006年	3,922例	68.6%	22.1%	2.8%	6.5%
2007年	4,617例	74.3%	11.5%	5.5%	8.7%
2008年	4,321例	64.0%	21.2%	3.9%	10.9%

感染症情報センターホームページより抜粋

**血清型が多数存在する腸管出血大腸菌による食中毒を防止するためには、大腸菌O157、O26、O111の検査に加え、ベロ毒素の検査を実施することが望ましい**

## <特徴>

### 低コスト

1テスト700円と現在市販されているキットの中で最も安価です。

### 簡便な操作と容易な判定

試料溶液をテストプレートに滴下し、15分後に赤紫色のラインを確認するだけです。

### VT1とVT2の識別が可能

1本のテストストリップでベロ毒素の有無だけでなく、VT1とVT2の識別が可能です。

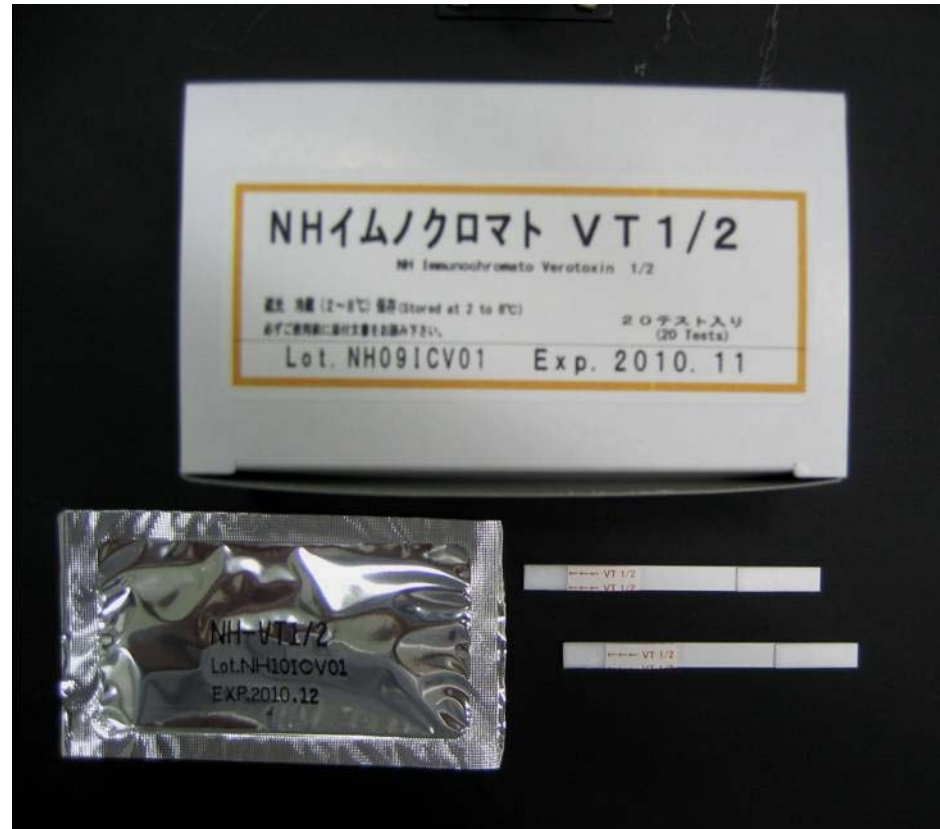
### 大腸菌O157、O26、O111と同時に検査可能

大腸菌O157、O26、O111検査用に増菌した培養液から検査可能です。

## <NHイムノクロマトシリーズラインナップ>

品名	容量	希望納入価
NHイムノクロマト O157	20回用	10,000円
NHイムノクロマト O26	20回用	10,000円
NHイムノクロマト O111	20回用	10,000円
NHイムノクロマトサルモネラ	20回用	10,000円
NHイムノクロマトリステリア	20回用	14,000円
NHイムノクロマトカンピロバクター	20回用	14,000円
<b>NHイムノクロマト VT1/2</b>	<b>20回用</b>	<b>14,000円</b>

●貯法：冷蔵(2~8℃)保存 ●使用期限：製造日より12ヶ月



## 試料溶液の調製

### 【食品から検出する場合】

被検食品25gに対し、ノボビオシン加mEC培地  
225mLを加え、1分間スマッカー処理を行う



スマッカー一袋ごと、42℃で18～24時間培養  
※培養時間はできるだけ長くすること。



培養液1mLを滅菌済み容器に分注



分注した培養液に、終濃度0.5mg/mLとなるように  
ポリミキシンB溶液を添加



37℃の恒温水槽中で30分間加温  
※5～10分おきに振とうすることを推奨



室温に戻した後、試料溶液とする。

※30分の加温後、1,500×g、15分間遠心分離を行うことを推奨

### 【分離コロニーから検出する場合】

被検コロニーを腸管出血性大腸菌分離培地、もしくは  
CAYE培地に接種し、37℃で培養を行う。

腸管出血性大腸菌分離培地: 18～24時間

CAYE培地: 6～24時間



＜腸管出血性大腸菌分離培地の場合＞  
培地表面のコロニーを採取し(3分の1～全面)、  
0.5mg/mLポリミキシンB溶液1mLに懸濁させる。

＜CAYE培地の場合＞  
終濃度0.5mg/mLとなるようにポリミキシンB溶液を  
添加



37℃の恒温水槽中で30分間加温  
※5～10分おきに振とうすることを推奨



室温に戻した後、試料溶液とする。

※30分の加温後、1,500×g、15分間遠心分離を行うことを推奨

## 試験操作

テストストリップをアルミ包装のまま室温に戻してから、使用直前にアルミ包装から取り出す  
※1:テストストリップが吸湿した場合、正しい結果が得られない可能性があるため、十分室温に戻すこと  
※2:テストストリップを持つ場合には、吸収パッドを持ち、試料滴下部および展開部に触れないこと

吸収パッドに油性ペン等を用いて、検体名もしくは検体番号を記入

試料滴下部へ試料溶液を添加

### 【添加方法1】

テストストリップを水平な台の上に静置し、  
試料滴下部へ試料溶液100 $\mu$ Lを添加

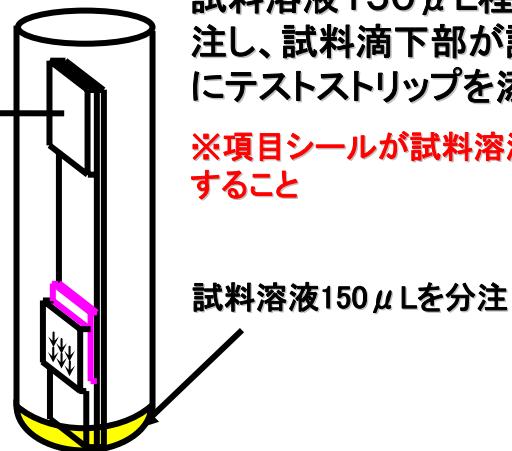
※テストストリップから溢れないよう注意すること



### 【添加方法2】

試料溶液150 $\mu$ L程度を試験管等へ分注し、試料滴下部が試料溶液に浸るようにテストストリップを添加

※項目シールが試料溶液に浸らないよう注意すること



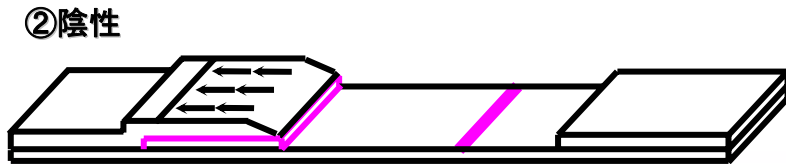
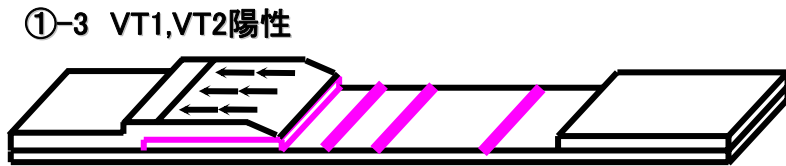
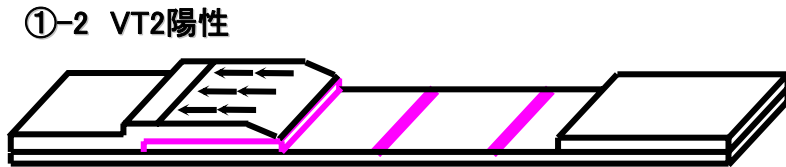
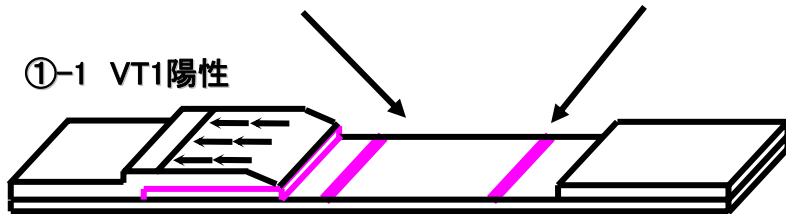
15分後に目視で結果判定

## 結果の判定

※取扱説明書末尾の判定シートを利用して、テストライン出現位置を確認すること

テストライン出現位置  
VT1: 試料滴下部より28mm  
VT2: 試料滴下部より32mm

コントロールライン出現位置  
(試料滴下部より40mm)



- ①-1: 試験開始後15分後にVT1テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察された場合には、VT1陽性と判定。
- ①-2: 試験開始後15分後にVT2テストライン出現位置およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察された場合には、VT2陽性と判定。
- ①-3: 試験開始後15分後にVT1テストライン出現位置、VT2テストライン出現位置、およびコントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察された場合には、VT1およびVT2陽性と判定。
- ②: テストライン出現位置に赤紫色のラインが観察されず、コントロールライン出現位置にのみ赤紫色のラインが観察された場合には陰性と判定。
- ③: コントロールライン出現位置に赤紫色のラインが観察されない場合には、テストラインの有無に関わらず再試験を実施。

注1: 赤紫色のラインの濃淡に関わらず、ラインが観察された場合には陽性と判定。

注2: 陽性を示した検体については、他の方法(PCR法等)にて必ず確認試験を実施すること。

注3: 高濃度のVT1もしくはVT2が試料溶液中に存在する場合、VT1テストラインおよびVT2テストラインともに観察される可能性あり。

# 性能～精製ベロ毒素での感度試験～

## 【試験方法】

- ① VT1およびVT2の精製品をmEC培地にて希釈
- ② 希釈したVT1、VT2溶液、およびノボビオシン加mEC培地、CAYE培地100 $\mu$ Lを滴下
- ③ 15分後に目視判定

	ベロ毒素濃度			
	5ng/mL	2.5ng/mL	ノボビオシン加 mEC培地	CAYE培地
VT1	陽性	弱陽性	陰性	陰性
VT2	陽性	陽性	陰性	陰性

**NHイムノクロマトVT1/2の検出感度は、  
VT1、VT2ともに2.5ng/mL**

# 性能～腸管出血性大腸菌培養液での確認～

## 【試験方法】

- ① PCR法にてベロ毒素産生性を確認した被検菌株をノボビオシン加mEC培地にて42℃、22時間培養
- ② 培養液をポリミキシンB処理
- ③ 培養液100μLを滴下し、15分後に目視判定

血清型	菌株	本キット試験結果		PCR法試験結果	
		VT1	VT2	VT1	VT2
O157	ATCC43888	陰性	陰性	陰性	陰性
O157	分離株1	陽性	陽性	陽性	陽性
O121	RIMD05091859	陽性	陽性	陽性	陽性
O111	RIMD05091865	陽性	陰性	陽性	陰性
O111	分離株2	陽性	陽性	陽性	陽性
O111	分離株3	陽性	陰性	陽性	陰性
O111	分離株4	陽性	陽性	陽性	陽性
O26	IID3005	陽性	陰性	陽性	陰性

**PCR法での試験結果と良好な一致率を示した。**

## 【試験方法】

- ① ベロ毒素非産生の被検菌株をトリプトソーヤブイオンにて37℃、22時間培養
- ② 培養液をポリミキシンB処理
- ③ 培養液ならびに100μLを滴下し、15分後に目視判定

菌名	株番号	本キット試験結果	
		VT1	VT2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43888	陰性	陰性
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 700728	陰性	陰性
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	陰性	陰性
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	陰性	陰性
<i>Escherichia hermanii</i>	JCM 1473	陰性	陰性
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	陰性	陰性
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	陰性	陰性
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	陰性	陰性
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 49141	陰性	陰性
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	陰性	陰性

菌名	株番号	本キット試験結果	
		VT1	VT2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 8724	陰性	陰性
<i>Serratia liquefaciens</i>	ATCC 27592	陰性	陰性
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 8100	陰性	陰性
<i>Serratia odorifera</i>	ATCC 33077	陰性	陰性
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380	陰性	陰性
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	陰性	陰性

**増菌培地および被検菌株に  
対する偽陽性は  
認められなかった。**

# 性能～食品検体での確認～

## 【試験方法】

- ① 被検食品25gに対し、ノボピオシン加mEC培地225mL、およびVT1、VT2産生大腸菌を $10^3$ cfu/mLを加え、1分間ストマッキング
- ② 42℃、22時間培養後、培養液をポリミキシンB処理
- ③ 培養液100μLをテストストリップに滴下し、15分後に目視判定

被検食品	ベロ毒素大腸菌未接種		ベロ毒素大腸菌接種	
	VT1試験結果	VT2試験結果	VT1試験結果	VT2試験結果
ほうれん草	陰性	陰性	陽性	陽性
カイワレダイコン	陰性	陰性	陽性	陽性
牛肉(こま切れ)	陰性	陰性	陽性	陽性
豚肉(ひき肉)	陰性	陰性	陽性	陽性
豚肉(こま切れ)	陰性	陰性	陽性	陽性
鶏肉(ひき肉)	陰性	陰性	弱陽性	陽性
鶏肉(モモ肉)	陰性	陰性	陽性	陽性

- ベロ毒素産生大腸菌未接種の被検食品はすべて陰性を示した。
- ベロ毒素産生大腸菌を接種した被検食品はすべて陽性を示した。