

NH イムノクロマト O157 <<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 O157 は、食品検査室において様々な食品検体からの大腸菌 O157 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。本キットは生牛挽肉での検査について妥当性確認を行い、AOAC-R1 PTM 認証を取得しました。試験の結果、牛挽肉 25 g 中に 1 CFU の大腸菌 O157 が存在した場合、本手法により検出できることが示されています。

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。

【バリデーション】

NH イムノクロマト O157 は、生の牛挽肉中に存在する大腸菌 O157 の検出について、AOAC-R1 による PTM 認証を受けています。バリデーションにおいては増菌培地として mTSB 培地を使用しました。

【はじめに】

腸管出血性大腸菌(EHEC)は出血性下痢や出血性大腸炎の原因となります。出血性大腸炎は溶血性尿毒症候群に発展する可能性があります。死亡する症例も報告されています。EHEC は汚染した食品や飲料水の摂取により感染しますが、O157:H7 による感染例が最も多く、毎年世界中で何万人もの感染者が報告されています。

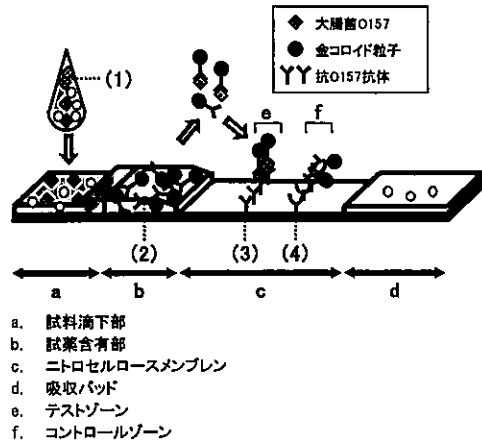
NH イムノクロマト O157 は、イムノクロマト法を用いた大腸菌 O157 の検出キットで、簡便な操作で短時間に結果を得ることができます。操作に習熟を必要とせず、特別な検出装置も必要ありません。

【キットの内容】

- A: テストストリップ 2 テスト×10 袋(20 テスト)
- B: 取り扱い説明書 1 部
- C: ビニールパウチ袋 1 枚

【検出原理】

1) テストストリップ各部名称



注1: 試料滴下部(a)やニトロセルロースメンブレン(c)に手で触れたり傷をつけ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が滴下されると、試薬含有部を通過して移動します。大腸菌 O157 (1)が試料中に存在した場合、試薬含有部を移動する際に金コロイド標識抗大腸菌 O157 抗体(2)と複合体を形成します。この複合体はニトロセルロースメンブレンを移動します。メンブレン中のテストゾーン(3)には抗大腸菌 O157 抗体が固定されており、大腸菌 O157 と金コロイド標識抗体の複合体がテストゾーンに集積することにより、赤紫色のラインが出現します。

メンブレン中のコントロールゾーン(4)には金コロイド標識抗大腸菌 O157 抗体が捕捉されるため、試料溶液中の大腸菌 O157 の有無にかかわらず、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】

本キットでは培養前の試料に 25 g あたり 1 CFU の大腸菌 O157 が存在するときに陽性を示します。1 × 10⁴~10⁶CFU/mL の大腸菌 O157 を含む増菌培養液は陽性と判定されます。

注2: 最小検出感度は菌株や培養液中の成分により変動する場合があります。最小検出感度は AOAC-R1 による妥当性確認は実施していません。

【使用上の注意】

- (1) 大腸菌 O157 は微量でも感染することが知られています。NH イムノクロマト O157 の使用者は、無菌操作技術に習熟している必要があります。試料や増菌培養液、ならびに使用済みのテストストリップを取り扱う場合には十分に注意してください。
- (2) 使用期限の過ぎたテストストリップは使用しないでください。使用期限はアルミ包装およびキット外装箱に記載されています。
- (3) 試料や検査担当者、環境への汚染拡散を防止するため、適切な微生物検査手順にて試験を実施してください。
- (4) *Citrobacter freundii* の一部および *Salmonella* Kumasi (O30)は、大腸菌 O157 と同一の抗原を保有しているため、偽陽性反応を示す可能性があります。

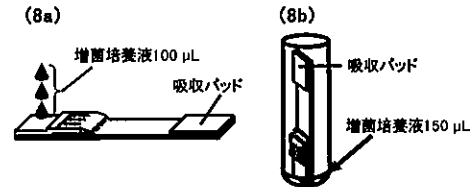
【別途ご準備いただく試薬・器具等】

1. 増菌培地(ノボピオシン加 mEC、mEG、ノボピオシン加 mTSB、mTSB 等)
 2. ストマッカー、ストマッカー袋(フィルター付きを推奨)
 3. オートクレーブ
 4. インキュベーター(42±1℃)
 5. はかり(25 g の計量が可能なもの)
 6. 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とディスポーザブルチップ
 7. タイマー
 8. 増菌培養液減菌用ディスポーザブルポリプロピレン製試験管
- その他

【試験操作】

- (1) 25 g の被検食品をストマッカー袋に量り取り、増菌培地(ノボピオシン加 mEC、mEG、ノボピオシン加 mTSB、mTSB 等)225 mL を加えます。
- (2) ストマッカーで 1 分間ストマッキング処理します。
- (3) ストマッキング処理したサンプルを 42±1℃で 18-24 時間培養します。
- (4) インキュベーターから取り出したストマッカー袋を左右に揺らし、穏やかに培養液を攪拌してください。
- (5) 滅菌済みピペットを使用し、増菌培養液約 5 mL を適切な試験管に分注してください(注 3)。試験管のフタは、滅菌操作時はゆるく閉めるようにしてください。
- (6) オートクレーブ(121℃、20 分間)あるいは沸騰湯浴中での加熱(15 分間)により増菌培養液を滅菌してください。滅菌した増菌培養液は室温まで冷却した後、テストストリップに滴下してください(注 4)。
- (7) テストストリップをアルミ包装のまま室温(20-25℃)に戻してください。アルミ包装は使用前に開封してください(注 5、6)。

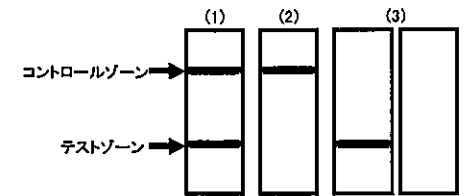
※増菌培養液は下記いずれかの方法(8a または 8b)により、テストストリップにて試験してください。



- (8a) テストストリップを水平な台の上に置き、100 µL の増菌培養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。
- (8b) 増菌培養液 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験溶液に浸かるように試験管に挿入してください(注 7)。
- (9) 増菌培養液の滴下から 15 分後に結果を判定してください。

- 注3: 残った増菌培養液は試験終了時まで減菌せずに保存してください。本キットによる試験の後、大腸菌 O157 の分離等の確認試験が必要な場合があります。滅菌していない増菌培養液は確認試験に使用できません。
- 注4: 滅菌操作は本キットを用いた試験の実施に必須ではありませんが、検査担当者への感染や増殖した病原菌による汚染拡散の危険性を低減させるため、実施することを推奨しています。
- 注5: テストストリップの吸湿を避けるため、アルミ包装の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。未使用のテストストリップは乾燥剤とともにキット添付のビニールパウチ袋に入れ、冷蔵(2-8℃)にて保管してください。
- 注6: 試料滴下部やニトロセルロースメンブレン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を持つようにしてください。
- 注7: 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。

【試験結果の判定】



- (1) 陽性: 試料溶液の滴下から 15 分後に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。
- (2) 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。
- (3) 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8: 本キットで陽性結果が得られた試料については、USDA/FSIS MLG 5.08 等の公的な試験法による確認試験を実施してください。本キットによる試験のために調製した増菌培養液を確認試験で使用できます。USDA/FSIS MLG 5.08 に従って確認試験を行う場合には、試料の増菌培養に mTSB を使用する必要があります。

【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: NH イムノクロマト O157 は遮光して冷蔵(2-8℃)保存してください。凍結は避けてください。
- (2) 使用期限: 製造日より 12 ヶ月。

【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から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、お客様ご自身でご確認ください。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。

【問い合わせ先】

ご不明な点は販売元もしくは製造元までお問い合わせください。

● 販売元
(キット外装箱ラベルに記載)

● 製造元
日本ハム株式会社 中央研究所
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3 丁目 3 番地
電話 : 029-847-7825
Fax : 029-848-1256
E-mail: nh.kit@nipponham.co.jp
http://www.rdo.nipponham.co.jp

NH IMMUNOCHROMATO O157 <<Instruction Manual>>

* Read this manual before you start using this test kit

**[Intended use]**

NH Immunochromato O157 is intended for use in food testing laboratories for qualitative detection of *E. coli* O157 (including H7 and HNM) from various food products. Not intended for diagnostic use. The kit has been validated and received AOAC-RI PTM certification for use in raw ground beef. Results indicate the method is capable of detecting *E. coli* O157 in raw ground beef at initial levels as low as 1 CFU/25 g. This kit is intended for use by personnel familiar with the appropriate aseptic techniques for the isolation and identification of *E. coli* O157.

[Validation]

NH Immunochromato O157 has been PTM certified by AOAC-RI for use in *E. coli* O157 testing of raw ground beef. In the validation process, mTSB was used for the enrichment of the samples.

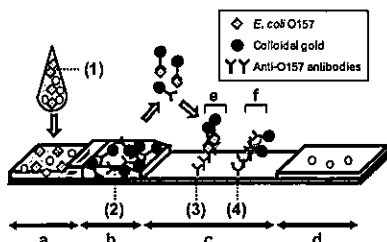
[Introduction]

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains can cause bloody diarrhea or hemorrhagic colitis in humans. Hemorrhagic colitis can progress to potentially fatal hemolytic uremic syndrome. EHEC is transmitted to humans through consumption of contaminated foods and water. Among EHEC, O157:H7 is currently the predominant serotype which infects tens of thousands of people worldwide every year.

NH Immunochromato O157 is an immunochromatographic test kit for simple and rapid testing of *E. coli* O157 including O157:H7. The kit does not require skilled personnel or well-equipped laboratory.

[Kit contents]

- A: Test strip 2 tests x 10 packs (20 tests)
 B: Instruction manual 1 sheet
 C: Plastic bag with zipper 1 piece

[Principle of assay]**1) Illustration of test strip**

- a. Sample application zone
 b. Reagent zone
 c. Nitrocellulose membrane
 d. Absorbent pad
 e. Test zone
 f. Control zone

Note 1: Do not scratch or touch with bare fingers on the sample application zone (a) or nitrocellulose membrane (c).

2) Principle of assay

When a sample solution is applied to the sample application zone of the test strip, it is wicked through reagent zone. *E. coli* O157 (1) in the sample binds to the colloidal gold-labeled anti-*E. coli* O157 antibody (2) in the reagent zone. The pathogen-antibody complex flows through the nitrocellulose membrane which contains a zone of antibody specific to *E. coli* O157. The immune complex is captured and concentrated in the zone (test zone) (3), eventually forms a reddish purple line. The membrane also contains a control zone where the gold-labeled anti-*E. coli* O157 antibody is captured. The control line forms in the control zone (4) regardless of the presence of *E. coli* O157 in the sample solution. The control line ensures the test is working correctly.

[Detection limit]

1 CFU/25 g of *E. coli* O157 can be regarded as the lowest detection limit. Enriched sample including 1×10^4 - 10^8 CFU/mL of *E. coli* O157 will yield a positive result.

Note 2: The lower detection limit of the kit may vary depending on the strain and components of the test solution. The detection limit claim is not validated by the AOAC-RI validation study.

[Precautions]

- E. coli* O157 has been shown to have low infective dose. Users of NH Immunochromato O157 should be familiar with the appropriate aseptic techniques for the isolation and identification of *E. coli* O157. Extreme care should be taken in handling samples, enriched cultures and used test strips.
- Do not use expired test strips. The expiration date is indicated on the aluminum pouches and the box.
- Good microbiological laboratory practices should be used to prevent contamination of samples, lab workers and the environment.
- Bacteria carrying O-antigen identical with that of *E. coli* O157, such as some strains of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* Kumasi (O3), can cause false-positive results.

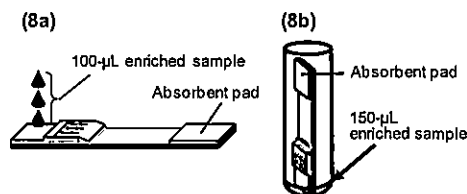
[Additionally required materials and instruments]

- Enrichment broth (e.g. mEC with novobiocin, mEC, mTSB with novobiocin, mTSB)
- Stomacher and stomacher bags (preferably with a filter)
- Autoclave
- Incubator ($42 \pm 1^\circ\text{C}$)
- Balance (capable of weighing 25 g)
- Disposable plastic transfer pipettes and/or appropriate micro pipettes and disposable tips
- Timer
- Disposable polypropylene tubes for sterilization of samples (optional)

[Test procedures]

- Weigh 25-g sample into the stomacher bag and add 225-mL enrichment broth, e.g. mEC with novobiocin, mEC, mTSB with novobiocin, mTSB.
- Homogenize with a stomacher for 1 minute.
- Incubate the homogenized sample at $42 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–24 hours.
- Remove the stomacher bag from the incubator and mix the culture gently using side-to-side motion.
- Transfer approximately 5-mL enriched sample into an appropriate test tube with a sterilized pipette (Note 3). Cover with a loose-fitting cap.
- Sterilize enriched sample by autoclaving (121°C , 20 minutes) or boiling (15 minutes). The sterilized sample solutions should be applied to test strips after cooling to room temperature (Note 4).
- Allow the test strips warm to room temperature (20 – 25°C) before opening the aluminum pouch. Open the pouch immediately before use (Notes 5, 6).

*Enriched sample should be applied to a test strip by either of following procedures (8a or 8b).



- Place a test strip on flat surface and with a new pipette tip apply 100 µL of the enriched sample, drop-wise to the sample application zone. Careful not to overload the sample application zone; overloading it may cause spillage.
- Transfer 150 µL of the enriched sample into a test tube with a new pipette tip. Put a test strip in the test tube immersing the sample application zone in the sample solution (Note 7).
- Observe the test result 15 minutes after applying the sample solution to the test strip.

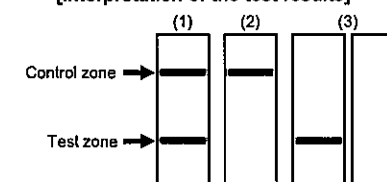
Note 3: Keep the remaining enriched samples unsterilized until the end of the test. Confirmatory tests, such as isolation of *E. coli* O157, might be required after testing with the kit. Unsterilized enriched samples can be used in confirmatory tests.

Note 4: Sterilization is not mandatory for the test performance but recommended to reduce the potential risk of infection and contamination.

Note 5: Do not open the aluminum pouch before it comes to the room temperature to prevent moisture absorption by test strips. Moist test strips can give incorrect test results. Unused test strips should be kept at 2 – 8°C in the plastic bag (provided with the kit) along with a desiccant sheet.

Note 6: Do not scratch or touch with bare fingers on the sample application zone or nitrocellulose membrane. Hold the absorbent pad when handling test strips.

Note 7: Keep the surface of sample solution below the arrows printed on the test strip.

[Interpretation of the test results]

- Positive results: Reddish purple lines appear in the test zone and the control zone in 15 minutes after application of sample solutions.
- Negative results: A reddish purple line appears in the control zone.
- Invalid results: No reddish purple line appears in the control zone.

Note 8: Presumptive positive results should be confirmed according to authorized methods such as USDA/FSIS MLG 5.08. The enriched samples prepared for testing with the kit can be used in confirmatory tests. Samples should be enriched in mTSB for confirmation according to USDA/FSIS MLG 5.08.

[Disposal]

Decontaminate used test strips, test tubes, pipettes, and enriched culture by autoclave, etc. in strict compliance with local, state and federal disposal regulations.

[Storage and expiration date]

- Storage: NH Immunochromato O157 should be stored at 2 – 8°C under protection from the light. NH Immunochromato O157 must not be frozen.
- Expiration date: 12 months from the date of manufacture.

[Warranty]

NH Foods Ltd. makes no warranty, whether expressed or implied. If any materials are defective, Distributor or NH Foods Ltd. will provide a replacement of the product. There is no warranty of merchantability or fitness for a particular purpose. Each user is expected to verify the appropriateness of each operative procedure and the application to individual food materials. NH Foods Ltd. shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

[Technical assistance]

For technical assistance, please contact distributor or manufacturer.

● Distributor
(Labeled on the box)

● Manufacturer
 R&D Center, NH Foods Ltd.
 3-3 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, Japan
 Phone: +81-29-847-7825
 Fax: +81-29-848-1256
 E-mail: nh.kit@nipponham.co.jp
 http://www.rdc.nipponham.co.jp