

試薬

- ・ 病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)
- ・ 磁気ビーズ: Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
(TermoFisher SCIENTIFIC社製, ベリタス社販売)
- ・ 0.1%BSA加PBS
- ・ 10mMPBS(pH7.4)

器具

- ・ 1.5ml マイクロチューブ
- ・ 磁気ビーズ集菌用スタンド

方法

1. 1.5mlチューブを用意する。
2. 磁気ビーズをよく混和し, 上記チューブに250 μ l分注する。
3. 0.1%BSA加PBSを1ml加え洗浄する(洗浄1回目)。
4. 磁石を用いて磁気ビーズを集めた後, 上清を取り除く。
5. 0.1%BSA加PBSを1ml加え軽く混和する(洗浄2回目)。
6. 磁石を用いて磁気ビーズを集めた後, 上清を取り除く。
7. 0.1%BSA加PBSを980 μ l加え, 磁気ビーズを再浮遊させる。
8. 病原大腸菌免疫血清を20 μ l加える。
9. 室温で2時間, 転倒混和させながら磁気ビーズと抗体を反応させる。
10. 磁石を用いて磁気ビーズを集め, 上清を取り除く。
11. 10mM PBS(pH7.4)を250 μ l加え, 再浮遊させる。
12. 4°Cで保管

表1. 市販血清の凝集反応性

血清群	血清のロット(デンカ生研)			
	A	B	C	D
O6	-	-	-	-
O25	++	-	ND	ND
O27	-	-	+++	+
O148	+++	+++	ND	ND
O153	+++	+++	ND	ND
O159	+++	+++	ND	ND
O169	+++	+++	ND	ND

血清凝集反応は生菌を用い、スライド凝集法で行った。

表2. 自家調製免疫磁気ビーズの集菌効果

血清群	試料液中の菌数(cfu/ml)					未接種
	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
O6	ND	1+	-	-	-	-
O25	≥3+	2+	2+	1+	ND	-
O27	ND	≥3+	3+	2+	1+	-
O148	ND	≥3+	2+	1+	1+	-
O153	≥3+	3+	2+	1+	ND	-
O159	ND	≥3+	2+	1+	1+	-
O169	≥3+	2+	1+	1+	ND	-

SMAC寒天, 抗生物質加SMAC寒天, クロモアガーSTEC基礎培地,
DHL寒天平板上に発育した集落の平均値

1+: 1~9個, 2+: 10~99個, 3+: 100~999個

表3. 自家調製磁気免疫ビーズを用いた毒素原性大腸菌の検出

血清群	最少検出菌数(cfu/ml)			
	SMAC	抗生物質加 SMAC	クロモアガー STEC(基礎培地)	DHL
O6	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²
O25	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²
O27	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰
O148	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ⁰
O153	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹
O159	10 ⁰	10 ¹	10 ¹	10 ⁰
O169	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹

各血清群菌の階段希釈PBS菌液を試料とした