

免疫磁気ビーズを用いた細菌検査への応用

宮下 哲雄・澤田 陽子・志田 育子・坂倉 弘毅・村林 嘉郎
和田 文明(津保健福祉部)・岩出 義人(衛生研究所)

近年、腸管出血性大腸菌、ザイルルにおけるエボラ出血熱、サルモネラによる食中毒等の新興感染症又は、結核などの再興感染症の流行が見られる。

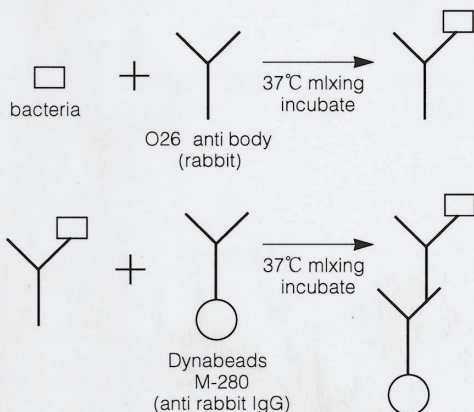
本県においても平成9年46名の腸管出血性大腸菌感染症の発生があり、的確な診断による患者の早期発見と迅速な対応が不可欠とされる。

伝染病や食中毒が発生した場合、患者や患者家族などの便検査等を実施するが、病原菌によっては分離に非常に手間がかかることがある。これを容易にするために免疫磁気ビーズを用いて、目的とする菌を効率よく分離する方法を検討したので報告する。

なお今回は腸管出血性大腸菌O26を用いて検討を行った。

測定原理

EC培地で増菌した培養液と病原性大腸菌O26の抗血清を反応させ、その混合液を免疫磁気ビーズに吸着後、ビーズのみを回収し分離培地で培養する。(下図参照)



試薬・機器

A. 免疫磁気ビーズ(Beads)

DYNAL社 Dynabeads M-280 Sheep Anti- Rabbit IgG

B. リン酸緩衝液(PBS) pH 7.4

NaH₂PO₄・H₂O0.16g
Na₂HPO₄・12H₂O.....1.98g
NaCl8.10g
蒸留水にて.....1 L

121℃ 15分高圧滅菌後4 ~8℃に保存

注)なおPBS作製時、埃等の混入がないように注意する。

C. Dynal MPC-M (MPC)

D. Dynal sample Mixer (mixer)

E. 病原性大腸菌O26免疫血清(抗血清)

方法

A. Beadsの前洗浄

- ① 1.5mLマイクロチューブにPBS 1mL分注
- ② ①にBeadsを分注
- ③ ②を3000rpm 2分間遠心
- ④ ③の上清を除去
- ⑤ ④にPBS 1mL分注
- ⑥ ③~⑤を三回繰り返す

B. 一次反応

- ① 1.5mLマイクロチューブに抗血清を分注
- ② ①に増菌培養させた菌液1mL分注
- ③ ②をMPC及び mixerにセット
- ④ ③を37℃ 1時間 反応

C. 二次反応

- ① 一次反応後の培養液に前洗浄した beadsを添加
- ② ①をMPC及び mixerにセット
- ③ ②を37℃ 1時間 反応

D. 分離・洗浄

- ① 磁石板を挿入したMPC及びmixerに二次反応終了した液をセット
- ② ①を3分間 静置
- ③ ②の上清を除去
- ④ 磁石を外して③にPBS 1mL分注
- ⑤ ④をMPC及びmixerにセット
- ⑥ ③～⑤を5回繰り返す

E. 培養

洗浄が終了したビーズと菌の複合体を分離平板培地へ塗抹培養

F. 菌確定試験

TSI寒天培地・LIM培地等に釣菌

考 察

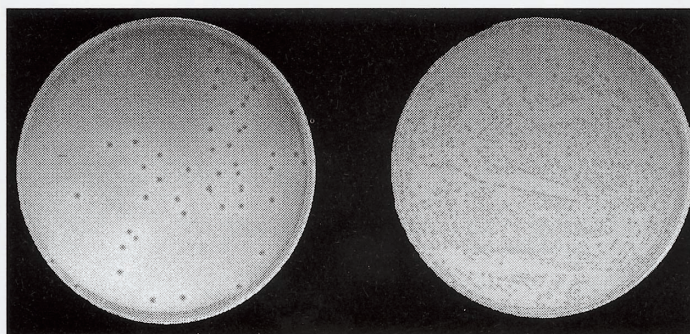
免疫磁気ビーズによる集菌には

- 抗原・抗体反応の最適比に入るように抗血清・免疫磁気ビーズの量を調節する。
 - 培地及び検体中に抗原抗体反応を阻害する物質がないこと(界面活性剤等)
 - あらかじめ目的とする菌の血清型タイプがわかっていること
 - 集菌によって菌が死滅しないことなどの条件が必要である。
- 今回の免疫磁気ビーズによる集菌法は、現在の検査法と併用すれば比較的検出感度が上がると考えられ、他の菌種にも応用ができ、且つ検査の汎用性が高められる可能性がある。

結 果

増菌培養液よりDHL寒天培地へ塗抹培養する従来法より、増菌培養液を免疫磁気ビーズ法で集菌し、DHL培地へ塗抹培養したほうが効率よく検出できた。

TC RAMC 寒天培地



未集菌

集菌後

参考文献

- 免疫磁気ビーズを用いた特定のK serotypeをもつVibrio Parahaemolyticusの選択的増菌法

友保 孝洋

- DYNABEADS LETTER Application Note No4
Technical Hand Book Second Edition

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門2-7-14 八洲ビル
TEL(03)3593-3211 [代] FAX(03)3593-3216
E-mail : veritas@veritastk.or.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>

RDBL2138
(99.08.05)PT