

テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キット

2015年1月作成

産業分野用検査キット 微生物検査用

TEMPO® EB (*Enterobacteriaceae*)

テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キットは、テンポシステム専用のキットで、食品中及び環境サンプル中の腸内細菌科に属する菌群の総数を 22~27 時間で測定します。

本品は、説明書をよく読んでから使用してください。

開発の経緯及び特徴

テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キットは、テンポシステム専用キットです。食品中及び環境サンプル中の腸内細菌科に属する菌群の総数を 35±1°C で培養し、22~27 時間で測定できます。

本品は、ISO 21528-2 (1) の標準法と同等の性能をもつように設計開発されました。

腸内細菌科は、腸内の病原菌や食品の変敗を起こす細菌を含むことから食品産業分野において非常に重要な指標とされています。また、衛生状態や食品の安全性の指標としても最も広く用いられています。

腸内細菌科の多くは病原性との関連性が弱いとされていますが、サルモネラ属、シゲラ属、大腸菌などのように広くヒトに病気を発現させる菌種も含まれています。

使用目的

食品中の腸内細菌科に属する菌群の総数の計数

測定原理

テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キットは、本品に特有の培地ボトルとカードで構成されています。

検体を培地ボトルに接種したあと、テンポフィルターを用いて、カードに注ぎ分注します。カードには 3 種類のサイズの 48 個のウェルが設けられています。カードには 10 倍毎に異なる 3 段階の大きさ (小、中、大) のウェルがそれぞれ 16 個存在します。このカードは MPN (Most Probable Number- 最確数) (2, 3) 法に相当するように設計されています。その後カードは密閉されます。テンポフィルターは、以降の操作におけるコンタミのリスクを避けるため、カードを密封します。

培地中には、pH が中性となった時蛍光シグナルを発生する pH インジケーターが含有されています。培養の間、カードのウェル内の該当菌が培地中の栄養成分と反応することにより、pH を低下させ、蛍光シグナルを発生させます。この蛍光シグナルが、テンポリーダーにより検出されます。各サイズのウェルにおける陽性数から、テンポシステムが MPN 法により、検体中に存在する腸内細菌科に属する菌群の総数を測定します。

キットの構成 (48 回用) :

テンポ EB カード 24 枚×2	トランスファーチューブ付きディスポーザブルカード そのまま用います。
テンポ EB 培地ボトル 24 本×2	4 mL 用 各ボトルは 1 回測定分の粉末培地を含有しています。
添付文書はキットに同梱されているか、又は http://products.sysmex-biomerieux.net/ よりダウンロード可能です。	

テンポ EB 培地ボトル乾燥培地組成

溶解後 (g/L)

ペプトン(野菜由来).....	10
糖類.....	26
塩化ナトリウム.....	5
発育補助剤.....	0.5
緩衝剤.....	16
デオキシコール酸ナトリウム*(ウシ・ヒツジ).....	0.75
蛍光性 pH 指示薬.....	0.05
消泡剤.....	0.4

pH 7.4

* 本品は > 1% のデオキシコール酸ナトリウムを含有しています。

本品を使用する際に必要な試薬又は器具

材料:

- テンポバック - 側面フィルター付のバッグ (品番 80015)
- パドル式ブレンダー
- 検体分注用 0.1 mL 又は 1 mL ピペット
- ボルテックスミキサー
- 35±1°C インキュベーター (設定温度保持可能なもの)

その他の試薬及び器具

推奨される食品検体の一次希釈液:

- 90 mL ペプトン水/ペプトン生理食塩水 (品番 AEB111499)
- 90 mL ペプトン緩衝溶液 (品番 42042)
- リン酸水素二カリウム溶液 (EN ISO 6887-5 (2010) 第 5.3 項) (4)
- Butterfield's リン酸緩衝溶液 (5)
- 各施設において、テンポシステムでの使用において、上記のものと同等であることが確認された希釈液

推奨される環境菌試験 (ふき取り検体) の一次希釈液:

- DIFCO® Neutralizing Buffer (品番 236210 Neutralizing Buffer for environmental samples)
- Modified Letheen ブイヨン (6)
- 各施設において、テンポシステムでの使用において、上記のものと同等であることが確認された希釈液

推奨される二次希釈液:

- 各施設において有効性が確認された滅菌精製水またはこれと同等の純水

精度管理用に推奨される器具及び材料:

- デンシマット (品番 99234)
- トリプケースソイ寒天培地 (品番 43011)

使用上又は取り扱い上の注意

- 本品は産業分野における微生物試験用です。
- 本品は微生物検査を熟知した人が使用してください。
- GLP (e.g., standard EN ISO 7218 (8)) に従ってください。
- 本品は動物由来成分を含有しています。由来及び衛生状態についての証明書によっても、伝染性病原菌の存在を完全に否定することはできません。従って、本品の取り扱いにあたっては、感染の危険性を考慮し、安全性の基準に則ってください（飲み込んだり、吸引したりしないこと）。
- 培地ボトル中の粉末培地を製造原料又は成分として使用しないでください。
- すべての検体及び検体を接種した培地は、感染の危険性があるものとして適切に取り扱ってください。本品による試験にあたっては、すべてのステップにおいて、細菌の取扱いに関する注意事項を遵守してください。Laboratory Biosafety Manual – WHO (Geneva)– Latest edition または国内の規制を参考にしてください。
- 使用期限を過ぎた試薬や消耗品は使用しないでください。
- 使用前に、包装及び構成試薬が未使用であることを確認してください。
- 培地ボトル内の粉末培地が均質なもののみ使用してください（凝塊又は水分のないこと）。
- 目視にて劣化の見られるカードは使用しないでください。
- 粉末培地を溶解しない状態で、検体を接種しないでください。
- テンポフィルターによる操作後に密封されていないカードは、以降の操作に使用しないでください。
- テンポカードの陽性ウエルの内容物を継代培養しないでください。
- カードのウエル又はバーコード上に書き込みをしないでください。
- カードには、ラベル、シールなどを一切貼付しないでください。
- テンポリーダー、テンポフィルター及びラックは、定期的に清拭し、消毒してください（ユーザーマニュアル参照）。
- 本書に記載した以外の使用方法では、正しい結果が得られないことがありますので、各ご使用施設でのバリデーションを実施してください。このような場合、ピオメリュー社としては、得られた結果に対しては責任を負えません。使用法の変更もしくは改変は、ピオメリューによる保証の対象外となります。

貯蔵方法及び使用期限

- テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キットは 2~8°C にて保存してください。
- キットのパッケージを開き、試薬類は 8°C より高い温度（上限は 25°C）で最大 1 ヶ月保管できます。室温に戻した日から 1 ヶ月後の日付を所定のバイアルボックスのラベルに記載してください (□)。但し、この日付は、ラベルに記載されている使用期限を越えて設定することはできません。
- カードは実験台又は培地スタンドなどに放置して、15 日以上光に晒さないでください。
- カードは直接紫外線に晒さないでください。
- 本品の保存条件のとおり保存するとき、すべての構成試薬は、ラベルに表示されている使用期限まで安定です。

食品検体

検体の種類

テンポシステムは、ヒト及び家畜やペットが食用とする食品の分析に使用することができます。

検体の準備

一次希釈液及び二次希釈液を室温（18~25°C）に戻します。（「本品を使用する際に必要な試薬又は器具」欄に記載の希釈液のリスト参照してください）。

検査する食品が該当する ISO 標準法に従って、検体を採取・調製してください。特に、

- バターやマーガリンについては、水層と油層を、EN ISO 6887-5 (2010) 第 9.5 項 (4) および EN ISO 6887-4 第 9.4.2.2 項 (7) の標準法に従って分離してください。
 - 酸性食品については、溶液調製時には pH が中性となっていることを確認してください (EN ISO 6887-4 第 8.2 項) (7)。
 - 芳香性ハーブ又はスパイス類、茶葉、浸出液等生育阻害作用があるものは、最低でも 1/400 以上の希釈をしてください (EN ISO 6887-4 第 9.5.4.4 項) (7)。
- これらの食品の試験には、1/400 以上希釈することをおすすめします（最初に 10 倍希釈液（一次希釈）を作成し、これを 0.1 mL とり、培地ボトル中の乾燥培地を溶解した溶液 3.9 mL に加えてください）。
- 検体の調製を行うには、まず一次希釈液で検体を 10 倍に希釈します（一次希釈）。例えば、90 mL のペプトン水に 10 g 又は 10 mL の検体を無菌的に加えます。テンポバッグ内で検体と希釈液を均質になるように混和します（テンポバッグの使用法は、テンポ検体登録ステーションのユーザーマニュアルを参照してください）。

上記の一次希釈検体のテンポカードへの注入は 45 分以内に行ってください。ただし、国際標準法により別途異なる指示のある場合はこの限りではありません (8)。

操作方法

詳細については、テンポシステムユーザーマニュアルを参照してください。

EN ISO 16140 規格に基づいた NF VALIDATION での (No. BIO 12/21-12/06) 承認プロトコールおよび AOAC RI (承認 No. 050801) の承認取得済み (9)

食品検体試験の操作手順

10~4.9×10⁴ CFU/g の測定範囲である 1/40 希釈液調製例が示されています。希釈率は予想される検体の汚染度により変更することができます。ISO での希釈倍率のみ使用可能です。

1. 必要な本数の培地ボトル（1 検体につき 1 本）を取りだし、30 分間試験室内に放置します。
2. 二次希釈液を入れたディスペンサーの目盛りを 3mL にセットし、ポンプを押し、最初の二押し分は廃棄します。
3. テンポ検体登録ステーションにログインします。
4. テンポ検体登録ステーションの画面表示に従って、検体名をキーボードから入力するか、バーコードリーダーで読み取ります。
5. ディスペンサーを用いて、培地ボトル 1 本につき 3 mL の二次希釈液を加えます。
6. 滅菌ピペットを用いて、テンポバッグ側面フィルター内から濾液を 1 mL とり、5. の培地ボトルに加え、ボルテックスミキサーで約 3 秒間攪拌します。得られた 4 mL の溶液は、検体の 40 倍希釈液にあたります。

7. 培地ボトル 1 本につきカード 1 枚を、トランスファーチューブの先端に触れないように取り出します。カードに表示されているコード（色と記号）と培地ボトルのコードが合致していることをチェックしてください。
8. テンポ検体登録ステーションの画面表示に従って、培地ボトル及びカードのバーコードを読み取ります。これにより、4. でエントリーした各検体と、使用する培地ボトル及びカードをリンクさせます。
9. 培地ボトルをフィリングラックに置きます。培地ボトルの向かい側のスロットにカードを差し込みます。このとき、カードに付されたトランスファーチューブの先が培地ボトルに入るようにします。ラックには 6 組まで培地ボトルとカードをセットすることができ、カードは 1 枚から 6 枚まで同時に分注することができます。
10. ラックをテンポフィルターにセットし、分注サイクルをスタートさせます。培地ボトルの内容物はすべてカードに吸引されます。分注が終了すると、テンポフィルターがトランスファーチューブを切断し、密封します。これらのすべての動作は自動的に行われ、3 分間で完了します。分注サイクルは全ての試験項目に共通で、異なる試験項目のカードへの分注を同時に行うことができます。
11. フィリングラックをテンポフィルターから抜き取り、培地ボトルに内容物が残存していないことを確認します。カードを抜き取り、培養ラックに移動します。カードのラベルが操作者の方（ラックの取っ手の方向）に向くように、培養ラックのスロットにカードを挿入します。同一温度で培養するカードはまとめて同じラックに入れてください。各培養ラックは 20 枚までカードを入れることができます。スロットとスロットの間にカードを挿入しないでください。
12. 使用済みの培地ボトルとトランスファーチューブは、適切な容器に廃棄してください。
13. ISO 21528-2 の標準法と同等の性能を得るため、カードを $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22~27 時間培養します (1)。

注：培養時間は、テンポリーダーソフトウエアにより管理されます。コンピュータはカードのバーコード読み取りから培養開始までの時間の理論値を 15 分と設定しています。もしも、実際の時間が 15 分より長い場合（2 時間を超えないようにしてください）は、超過分の時間はテンポリーダーソフトウエアにより表示される培養の残り時間に追加します。追加することにより実際の培養時間（ $35 \pm 1^\circ\text{C}$ インキュベーター内での培養時間）が 22 時間以上 であることを厳守してください。読取りは、コンピュータ設定されている 22~27 時間以内に実施するようにしてください。

TEMPO® の方法は、Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods の方法と比較された。：

- 肉（生豚挽肉、生牛挽肉、加熱調理済みローストビーフ）
- 鶏肉（生鶏挽肉、冷凍調理済み鶏肉、加熱加工網焼き鶏肉）
- 魚（冷凍キャットフィッシュ、加熱加工冷凍魚、生白身魚）
- 野菜（袋詰めサラダ、冷凍グリーンピース、ハッシュドブラウンポテト）
- 乳製品（バニラアイスクリーム、殺菌乳、粉ミルク）
- その他（殺菌卵、米、乾燥ペットフード）

カードの読取りと培養の終了

1. テンポ読取りステーションにログインします。
2. 読取りをさせるカードを搭載した培養ラックをリーダーに挿入します。リーダーは各カードのバーコードを読み取り、ウエルから発生する蛍光を読み取るにより自動的に検体のタイプ、希釈率、菌数測定結果を検体毎にまとめます。
3. 結果の表示:テンポ読み取りステーションの画面に、検体 1g 又は 1 mL あたりの colony forming units (CFU) 数が、検体 ID、試験項目、試験日とともに表示されます。
4. テンポ読取りステーションの画面にて、試験成績をプリントアウト又はユーザーのラボ情報管理システム (Laboratory information management system (LIMS)) に転送することができます。さらに、過去の試験成績を参照することも可能です。
5. 試験が終了したら、カードをラックから取り出し、適切な容器に廃棄してください。

注意：テンポ EB カードは、分注後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22~27 時間の培養に入る前に、 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ で最大 48 時間保管可能です (NF VALIDATION の範囲外)。この手順後にカードをリーダーで読み取った場合、得られた結果に、「本カードの読取り開始は遅すぎます」という注釈が付記されますが、当該カードは冷蔵保存後の培養後に読み取りを行った旨をコメント欄に記入してください。

環境菌試験 (NF VALIDATION の範囲外)

検体の種類

本試験法は、予め湿らせた綿棒によりサンプリングされた、器具、調理台または手のふき取り検体、クリーニングワイブまたはスポンジにより器具または調理台からサンプリングされた検体に適用できます。その他の環境由来検体を試験する場合は、各施設で本プロトコールまたは他のプロトコールの有効性を確認してください。

検体の準備

ふき取りに使用した綿棒、クリーニングワイブ、スポンジを直ちに一定量の推奨一次希釈液の入った試験管に直接、移してください。これが、**一次希釈** となります。

環境菌試験の操作手順例

ふき取りに使用した綿棒を、直ちに 10 mL の一次希釈液の入った試験管に直接、移してください。これが、10 倍希釈液 (**一次希釈**) となります。希釈液中で綿棒を注意深く振り、均質になるように混和します。試験管内部の縁で綿棒を回転させ溶液を搾り出してください。検体採取面あたり $10 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU の測定範囲となる 40 希釈での試験を推奨します。希釈率は予想される検体の汚染度により高くすることができます。

1. 必要な本数の培地ボトル (1 検体につき 1 本) を取りだし、室温に戻るまで放置します。
2. 二次希釈液を入れたディスペンサーの目盛りを 3 mL にセットし、ポンプを押し、最初の二押し分は廃棄します。
3. テンポ検体登録ステーションにログインします。
4. テンポ検体登録ステーションの画面表示に従って、検体名をキーボードから入力するか、バーコードリーダーで読み取ります。
5. ディスペンサーを用いて、培地ボトル 1 本につき 3 mL の二次希釈液を加えます。
6. 検体のふき取りを行った溶液が入っている試験管から滅菌ピペットを用いて、濾液を 1 mL とり、5. の

培地ボトルに加え、ボルテックスミキサーで約 3 秒間攪拌します。得られた 4 mL の溶液は、検体採取を行った環境由来検体の 40 倍希釈液にあたります。

7. この後の操作手順は、「食品検体試験の操作手順」の 7 から 13 を参照してください。

試験結果の判定法

読取りが終了すると、コンピュータにより結果の分析が自動的に行われ、陽性ウエルを検出します。各サイズのウエルにおける陽性数及び検体の希釈率より MPN 表を利用して、検体 1g 又は 1 mL あたりの菌数を CFU で表示します。

精度管理

テンポシステム専用試薬については、製造の各段階において、系統的に精度管理を実施しています。各施設において精度管理を行う場合、下記の菌株の使用を推奨します。

- Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™
- Escherichia coli* ATCC® 25922™
- Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC® 14028™

精度管理に推奨される方法:

- 培養はすべて、35±1°Cで行ってください。
- トリプケースソイ寒天培地を用いて 24 時間培養したコロニーをとり、ペプトン水に懸濁させ、デンシマットを用いて、マクファーランド濁度 0.5 に調整します。これはおよそ 10⁸ CFU/mL にあたります（「本品を使用する際に必要な試薬又は器具」の項参照）。菌濃度が理論上およそ 10² CFU/mL となるまで、ペプトン水で 10 倍希釈を繰り返します。*E. coli* および *S. enterica* serovar *typhimurium* については、10² CFU/mL の菌液 1 mL をとり、培地ボトルに接種します。培地ボトル内の粉末培地は、あらかじめ 3 mL の滅菌精製水で溶解しておきます。*E. faecalis* についても同様の手順で培地ボトルに菌液を接種しますが、接種する菌液の濃度は 10⁶ CFU/mL とします。
- テンポソフトウエアの希釈率を 1/4 に設定してください。
- 培地ボトル 1 本の内容物を 1 枚のカードに分注し、培養します。
- 同時に、10³ CFU/mL の菌液 0.1 mL をトリプケースソイ寒天培地に塗抹、培養し、カードに接種した菌液の濃度を確認します。
- 培養後、カードを読み取り、トリプケースソイ寒天培地での *E. coli* および *S. enterica* serovar *typhimurium* のコロニー数の計測および *E. faecalis* の生育を確認します。

参考正常値:

非腸内細菌科菌群の菌株

Enterococcus faecalis ATCC® 29212™ は、本キットにおいて完全に発育が抑制されます（この場合、テンポソフトウエアは、計数結果として < 1 CFU/g と表示します）。

腸内細菌科菌群の菌株

E. coli ATCC® 25922™ および *S. enterica* serovar *typhimurium* ATCC® 14028™ は、下記の数式により R 値を算出してください。

$$R = \frac{\text{テンポ試験結果 (CFU/g)}}{\text{TSA 上コロニー数} \times 10}$$

TSA : トリプケースソイ寒天培地
R は 0.01 ~ 1 の間に入ること

試験の結果、菌数が予期した数値と乖離しているときは、バイオメリュー社にご連絡ください。

ただし、各国又は地域の標準法に則って、精度管理を実施する場合は、各施設の責任において実施してください。


操作上の留意事項

- カードへの菌液の分注が正しく行われていない場合（空のウエルがあるとき、又は培地ボトルに菌液が残存しているとき）は、誤った結果が得られることがあります。例えば、「本品を使用する際に必要な試薬又は器具」欄で推奨しているもの以外のフィルターバッグを使用したときなどです。
- 本説明書に記載のとおりには検体の調製、保存を行わない場合、誤った結果が得られることがあります。
- **警告:** 本試験については、膨大な食品検体を用いて評価を行っています（ソフトドリンクを除く）。しかしながら、製品及び製造工程は多岐にわたるため、各検査室において、試験する食品成分が結果に影響を与えないことを確認してください。特に一次希釈検体が強度に着色しているとき（フルーツピューレ、ココア等）、またはテンポカード内での培養中に酸化反応により着色しているとき（生のマッシュルーム類等）は、蛍光シグナルに影響を及ぼす可能性があります。この場合、試験を行う際には、食品検体を 1/400 以上希釈することを推奨します。

詳細は、テンポユーザーマニュアルをご参照ください。

テンポ EB 大腸菌計数キットは、飲料、生乳及び蓄牛の試料以外の人及び家畜の食用となるあらゆる食品の分析に用いられる検査法として、EN ISO 16140 (9)にもとづく、NF VALIDATION により承認されました。この承認は、本品と ISO 21528-2 (1)に記載されている国際標準法とを比較検討した結果により得られました。

BIO 12/21-12/06 認証書は、バイオメリュー社にご依頼いただければ提供いたします。また、NF VALIDATION 証明書内に本書の有効期限が記載されています。



BIO 12/21 - 12/06
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
Certified by AFNOR Certification
www.afnor-validation.org
www.afnor-validation.com

TEMPO® EB 試験法は、各食品の腸内細菌科菌群の菌数測定において、2008 年 5 月の AOAC Research Institute (証明書 No. 050801)によってその有効性が確認されています。



050801 - 05/07/08
PERFORMANCE TESTED METHOD
Certified by AOAC Research Institute
www.aoc.org

廃棄

使用済み又は未使用の試薬類及びその他の材料は、感染性物質取扱いの手順にしたがって廃棄してください。廃棄物及び汚染水の排水については、各施設の責任において、それらの性質及び有害性の度合いに応じ、適切に取扱いかつ処理してください。

包装単位

テンポ EB 腸内細菌科菌群計数キット・・・48 回

参考文献

1. International Standard ISO 21528-2 (2004) – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2: Colony-count method.
2. Cochran W.G.
Estimation of bacterial densities by means of the “Most Probable Number”
(1950) *Biometris* 6, 105-116
3. Woodward R.L.
How probable is the most probable number ?
(1957) *J. Am. Water Works Assoc.*, 49, 1060,1068.
4. International Standard EN ISO 6887-5 (2010) – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5 : Specific rules for the preparation of milk and milk products.
5. Bacteriological Analytical Manual Online
BAM Reagent R11 (January 2001).
6. Bacteriological Analytical Manual Online
BAM Media M79 (January 2001).
7. International Standard EN ISO 6887-4 – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products.
8. International Standard EN ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.
9. International Standard EN ISO 16140 (2003) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.

【問い合わせ先】

シスメックス株式会社
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階
TEL 0120-022-328

シスメックス・ビオメリュー株式会社
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階
TEL 03-6834-2666 (代表)








【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

シスメックス・ビオメリュー株式会社
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号 大崎セントラルタワー8階

* 本添付文書は、下記 Web サイトからダウンロードできます。

<http://products.sysmex-biomerieux.net/>

記号

記号	内容
	品番
	製造元
	保管温度
	使用期限
	ロット番号
	添付文書を参照
	<n>回分の試験を含む

BIOMERIEUX、青いロゴおよび TEMPO は、bioMérieux またはその子会社に帰属するもしくは登録済みあるいは登録予定の商標です。.

ATCC の商標、商号および ATCC の品番は、American Type Culture Collection に帰属します。.

DIFCO は Difco Laboratories Incorporated Corporation が所有しています。

その他の名称や商標はすべてそれぞれの所有者に帰属しています。



RCS LYON 673 620 399
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com