

## テンポ LAB 乳酸菌計数キット

2009年10月作成

産業分野用検査キット 微生物検査用

## TEMPO® LAB (Lactic Acid Bacteria)

テンポ LAB 乳酸菌計数キットは、テンポシステム専用のキットで、食品中の乳酸菌数を 40-48 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 LAB 乳酸菌計数キットは、食品中の乳酸菌数を 40-48 時間で測定するテンポシステム専用キットです。本品は、NF ISO 15214(1)および American Public Health Association's Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods(2) の推奨法と同等の性能をもつように設計開発されました。

## 使用目的

食品中の乳酸菌数の計数

## 測定原理

テンポ LAB 乳酸菌計数キットは、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)(3,4)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。培養の間、カードのウェル内の乳酸菌が培地中の基質と反応することにより、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、検体中に存在する乳酸菌数を測定します。

## キットの構成 (48 回用) :

テンポ LAB 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 LAB 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

## テンポ LAB 培地ボトル乾燥培地組成

溶解後( g/L)	
ブドウ糖.....	14
栄養素 (ウシ・ブタ) .....	4
その他栄養素.....	12.5
緩衝剤および阻害剤.....	17.4
酵素基質.....	0.05
消泡剤.....	0.4
pH 5.7	

## 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 (バイオメリュー品番 80 015)
- ストマッカー(モデル 400 型もしくはそれと同等のもの)
- 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
- 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:

- ペプトン水 / ペプトン生理食塩水(90ml-バイオメリュー品番 42 021)
- ペプトン緩衝溶液(90ml-バイオメリュー品番 42 042)
- 乳製品のみを使用: クエン酸ナトリウム溶液 又は リン酸水素 2 カリウム溶液 ( EN ISO 8261 : 2001 5.3 項に従うこと (5))
- Butterfield's リン酸緩衝溶液 (6)
- 各施設において、テンポシステムでの使用にあたり、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 Lethen プイオン(7)
- 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:

- 滅菌精製水または各施設において有効性が確認されたこれと同等の純水

## 精度管理用に推奨される器具及び材料:

- デンシマット (バイオメリュー品番 99 234)
- コロンビア 5%ヒツジ血液寒天培地 (バイオメリュー品番 43 041)
- トリプケースソイ寒天培地 (バイオメリュー品番 43 011)

## 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正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、細菌の取り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（ユーザーズマニュアル参照）。
- 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、バイ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、バイ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 LAB 乳酸菌群計数キットは 2-25°C にて保存してください。
- キットのパッケージを開き、カードを取り出すたびに、残りのカードの入ったパウチ又はブリスターパックを注意深く再密閉してください。
- 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、ヒトおよび家畜が食用とする多くの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）。

検査する食品が該当する ISO 標準法（もしくは適用可能な場合 BAM 法(6)）に従って、検体を採取・調製してください。特に、

- 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）(8)。
- 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）(8)。

検体の調製を行うには、まず推奨の一次希釈液で検体を 10 倍に希釈します（一次希釈）。例えば、90mL のペプトン水に 10g 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ズ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(9)。

## 操作方法

詳細については、テンポシステムユーザーズマニュアルを参照してください。

## NF ISO 15214(1)に準拠した試験と同等の性能を得るためのプロトコール

### 食品検体試験の操作手順

測定範囲が  $100 \sim 4.9 \times 10^5$  CFU/g である 1/400 希釈より高い希釈率で通常設定することを推奨します。測定範囲が  $10 \sim 4.9 \times 10^4$  CFU/g である 1/40 希釈は、総微生物菌数が低い（例：サラダドレッシング）検体にもみ使用して下さい。1/40 希釈の場合、一次希釈液として使用できることが確認されているものとしては、ペプトン水、ペプトン生理食塩水、Butterfield's リン酸緩衝溶液があります（操作上の留意事項参照）。

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 3.9mL にセットし、ポンプを押し、最初の 2 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 3.9mL 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 0.1 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 4mL の溶液は、検体 1/400 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ラーにセットし、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、テンポフィラ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ラーから抜き取り、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. NF ISO 15214(1)と同等の性能を得るため、カードを  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  で 40-48 時間培養します。

### Compendium chapter 19 (2) に準拠した試験と同等の性能を得るためのプロトコール

MRS (pH 5.5)寒天培地を用い、嫌気条件下  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で 72 $\pm$ 3 時間培養した場合と同等の性能を得るためには、上述の手順 1 から 12 と同様に操作し、カードを  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で 40-48 時間培養します。

**注 1:** 培養時間は、テンポリーダーソフトウェ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ェアにより表示される培養の残り時間に追加します。読み取りは、コンピュータ設定されている 40-48 時間以内に実施するようにしてください。

**注 2:** 培養温度は、所定温度の  $\pm 1^\circ\text{C}$  の範囲に入るように厳密に管理して下さい。

### カードの読み取りと培養の終了

1. テンポ読み取りステーションにログインします。
2. 読み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、ウェルから発生する蛍光を読み取ること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。  
培養後のテンポ LAB カードの読み取りは、 $2-8^\circ\text{C}$  で保存することにより最大 48 時間遅らせることが可能です。この場合、カードを冷蔵庫から取り出し、約 30 分間試験室に放置し、室温にもどしてからリーダーでの読み取りを行ってください。得られた結果に、「本カードの読み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。
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. テンポ読み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。

### 環境菌試験

#### 検体の種類

本試験法は、予め湿らせた綿棒により、器具、調理台または手のふき取り試験に適用できます。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を、直ちに所定量の一次希釈液の入った試験管に直接、移してください。これが一次希釈液となります。

## 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 10mL 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 1/40 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、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 2 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 3mL 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、濃液を 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 4mL の溶液は、検体採取を行った環境由来検体の 1/40 希釈液にあたります。
7. テンポソフトウェアの希釈率を 1/40 に変更して下さい。
8. 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

読み取りが終了すると、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。

*Lactobacillus plantarum* ATCC® 14917

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

## 精度管理に推奨される方法:

- 培養は、各施設で使用する温度によって  $30 \pm 1$  °C あるいは  $35 \pm 1$  °C で行ってください。*Lactobacillus plantarum* をコロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地で培養する際には、徹底気または嫌気条件下で行って下さい。
- *Lactobacillus plantarum* の場合、コロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地を用いて 48 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 0.6 に調整します。これはおよそ  $10^8$  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)。*Bacillus subtilis* の場合は、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 1 に調整します。これはおよそ  $10^8$  CFU/mL にあたります。菌濃度が理論上およそ  $10^3$  CFU/mL となるまで、ペプトン水で 10 倍希釈を繰り返します。*Lactobacillus plantarum* については、 $10^3$  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 3mL の滅菌精製水で溶解しておきます。*Bacillus subtilis* 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  $10^5$  CFU/mL とします。

- テンポソフトウェアの希釈率を 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、 $10^3$  CFU/mL の菌液 0.1mL を、*Lactobacillus plantarum* の場合はコロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地、*Bacillus subtilis* の場合は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、カードの読み取りをするとともに、*Lactobacillus plantarum* はコロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地上の、*Bacillus subtilis* はトリプケースソイ寒天培地上のコロニー数を計数します。

## 参考正常値:

### *Lactobacillus plantarum* 株の場合

下記の数式により R 値を算出してください。

$$R = \frac{\text{テンポ測定結果(CFU/g)}}{\text{コロンビア5\%ヒツジ血液寒天培地上のコロニー数} \times 10}$$

R は 0.1 ~ 10 の間に入る

*Bacillus subtilis* 株は、本キットにおいて完全に発育が抑制されます(この場合、テンポソフトウェアは、計数結果として < 1 CFU/g と表示します)。

試験の結果、菌数が予期した数値と乖離しているときは、バイオメリュー製品取り扱いの会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)、または粉末ケーキの素などの乾燥製品(一次希釈液が濁度を有しているため)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。
- 本キットは、好熱性菌のスターター培養菌体の菌数測定には適していません。
- 製造技術上好熱性の乳酸菌菌叢を含む食品検体(例: 加熱圧搾されたチーズ等)については、30°C での培養では、テンポでの測定値が低くなる可能性があります。
- 1/40 の希釈率では、一次希釈液としてペプトン緩衝液およびリン酸水素二カリウム溶液は使用しないで下さい。これは、これらの溶液がテンポ LAB 培地の pH に影響を及ぼすためです。

詳細は、テンポユーザーズマニュアルをご参照ください。

**廃棄**

使用済み又は未使用の試薬類及びその他の材料は、感染性物質取り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、適正に取り扱いかつ処理してください。

**包装単位**

テンポ LAB 乳酸菌計数キット・・・48 回用

**参考文献**

- Standard NF ISO 15214 (1998) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C.
- American Public Health Association (2004) 4<sup>th</sup> Edition. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, chapter 19, Acid-Producing Microorganisms, §19.522 Acidified MRS Agar.
- Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". (1950) Biometrics 6, 105-116.
- Woodward R.L. How probable is the most probable number? (1957) J. Am. Water Works Assoc., 49, 1060,1068.
- International Standard EN ISO 8261 (2001) – Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.
- Bacteriological Analytical Manual (1998) 8<sup>th</sup> Edition, Revision A, Chapter 1 “Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate”.
- Bacteriological Analytical Manual (1998) 8<sup>th</sup> Edition, Revision A, Appendix 3, M.79.
- 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.
- International Standard EN ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.

**シンボルマーク**

シンボル	意味
	品番
	製造元
	貯蔵温度条件
	使用期限
	ロット番号
	説明書参照
	Σ 回用

**お問い合わせ先**

シスメックス株式会社 科学計測事業部  
〒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)

製造販売元：[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]

bioMérieux、青いロゴ、び TEMPO は、bioMérieux SA 又はその子会社ないしは関係会社に帰属する使用中、申請中ないし登録済の商標であります。

ATCC は American Type Culture Collection が所有している商標です。  
その他の名称や商標はそれぞれの所有者が所有しています。



**bioMérieux SA**  
RCS LYON 673 620 399  
69280 Marcy-l'Etoile / France  
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
[www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)

**bioMérieux, Inc**  
Box 15969,  
Durham, NC 27704-0969 / USA  
Tel. (1) 919 620 20 00  
Fax (1) 919 620 22 11