

テンポ LAB 乳酸菌計数キット

2015 年 1 月作成

産業分野用検査キット 微生物検査用

TEMPO® 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、食品中及び環境サンプル中の乳酸菌数を 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、食品中及び環境サンプル中の乳酸菌数を 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) 及び 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

食品中及び環境サンプル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。
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 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
緩衝剤及び阻害剤	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 (ビオメリュー品番 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
- 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)
- 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 6887-5 (2010) 5.3 項 (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おいて、上記のものと同様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 ブイヨン (7)
- 各施設において、テンポシステムでの使用において、上記のものと同様であることが確認された希釈液

推奨される二次希釈液:

- 滅菌精製水又は各施設において有効性が確認されたこれと同様の純水

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)
- コロンビア 5% ヒツジ血液寒天培地 (品番 43041)
- トリプケースソイ寒天培地 (品番 43011)

使用上又は取扱い上の注意

- 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（例：EN ISO 7218 (9)）
- 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 又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、各施設で適宜バリデーションを実施してください。その場合、当社は得られた結果に対する責任を負いかねます。使用法の変更もしくは変更は、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

- テンボ LAB 乳酸菌群計数キットは 2~25°C にて保存してください。
- 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、ヒト及び家畜やペット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、浸出液等生育障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、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（9）。

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。

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 100~4.9x10⁵ 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 10~4.9x10⁴ 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）検体にも使用していただけます。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）を取り出し、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 3.9 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 3.9 mL の二次希釈液を加えます。
6. 滅菌ビペットを用いて、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 4 mL の溶液は、検体 400 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. ラックをテンポファイラーにセットし、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、テンポファイ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。分注サイクルはすべ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ァイラーから抜き取り、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。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ください。

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ことで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。
培養後のテンボ LAB カードの読取りは、 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 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、室温に戻してからリーダーで読取りを行ってください。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に読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 1 g 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、予め湿らせた綿棒を用い、器具、調理台又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又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 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）を取り出し、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 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 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 に変更してください。
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 1 g 又は 1 mL あたりの菌数を CFU で表示します。

精度管理

テンボ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±1℃あるいは 35±1℃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、微好気又は嫌気条件下で行ってください。
- *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 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）。*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 10⁸ CFU/mL にあたります。菌濃度が理論上およそ 10³ 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、10³ 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。*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 10⁵ 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 *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、テンポソフトウエアは、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、ビオメリュー製品取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（空のウェルがあるとき、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）が、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（フルーツピューレ、ココア等）が強度に着色している場合又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 400 倍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℃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。
- 40 倍の希釈率では、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ください。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、適切に取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

1. 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.
2. American Public Health Association (2004) 4th Edition. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods, chapter 19, Acid-Producing Microorganisms, §19.522 Acidified MRS Agar.
3. Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". (1950) Biometrics 6, 105-116.
4. Woodward R.L. How probable is the most probable number? (1957) J. Am. Water Works Assoc., 49, 1060,1068.
5. 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.
6. Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 1 "Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate" (April 2003).
7. Bacteriological Analytical Manual Online BAM Media M79 (January 2001).
8. 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.
9. International Standard EN ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.

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

【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

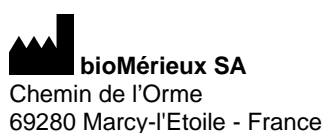
* 本添付文書は、下記 Web サイトからダウンロードできます。

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

BIOMERIEUX、青いロゴ及び TEMPO は、bioMérieux 及びその子会社に帰属する、登録された、あるいは登録予定の商標です。

ATCC の商標と商号及び ATCC の品番は、American Type Culture Collection の商標です。

いかなる他の名前及び商標もそれぞれの所有者の資産です。



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