MicroSnap™ Total
一般生菌迅速判定
必須パーツ
Step 1：MicroSnap Total 培養キット，MS1-TOTAL (QYT 100)
Step 2：MicroSnap Total 検出キット，MS2-TOTAL (QYT 100)

説明書：

MicroSnap Total は一般生菌数の検出と計測結果が 7 時間で得られる迅速生物発光法を用いた検査方法です。MicroSnap Total は、特殊な成長培地を含む培養キットと、細菌の産生するバイオマーカーを小型のポータブルルミノメータで計測する為の生体発光基質を含む検出キットから構成されます。

検査は細菌の成長を促進する短時間の培養と検出の 2 段階で行います。培養液での培養中、細菌は増加し干渉物質は減少します。細菌が増加することで、培地中に成長源が無くなり、バイオマーカーを生成します。サンプル内の細菌が増えるほど、バイオマーカーは増加、その発光量も大きくなります。その後、培養したサンプルの一部を検出キットへ適量移してアクティベートし、混合してルミノメータで測定します。光の強さは細菌量に比例します。

使用対象者：

検査担当者は一般的な微生物検査の技術・知識があるに越したことはありませんが、習熟者の指導のもとで使用方法を身につければ誰でも使用可能です。

適用性：

MicroSnap Total は食物、液体、環境表面で代謝的に生存できる好気性菌の計測に使用することができます。この手法は AOAC *Performance Tested MethodsSM* (PTM) Program に基づき、食物に関してバリデートされました。詳細については AOAC-RI PTM Certificate #031501 を参照してください。

用例：

MicroSnap Total 法は主要な測定基準として ATP 測定法に依拠します。MicroSnap Total は予想されるすべての製品について評価されたわけではありません。**安全と注意**をご確認ください。

MicroSnap は使用前に室温（18- 25 °C）に戻しておくことが大切です。4°C の冷蔵状態から取り出したばかりの試料で培養を開始すると、培養温度が 30 °C に達するまでにタイムラグが生じるため検出力が低下することとなります。

MicroSnap Total 検査に使用する媒体または希釈液は生物発光阻害物質を含まないものを使用することが大切です。微生物検出に失敗する最も大きな原因は、媒体または希釈液中の阻害物質です。Hygiena 社は以下に記載した希釈液を推奨します。

必要器材(同梱されていません)：

○30±0.5℃設定のインキュベーター
○EnSURE ルミノメータ（器材番号：EnSURE)
試料作製用：
○希釈液
・緩衝ペプトン水
・ペプトン加生理食塩水(MRD)
・バターフィールドのリン酸緩衝希釈水
○サンプルバッグ
○ホモジナイザー
○1ml 用のピペットおよびチップ

MicroSnap™ Total
一般生菌迅速判定
必須パーツ
Step 1：MicroSnap Total 培養キット，MS1-TOTAL (QYT 100)
Step 2：MicroSnap Total 検出キット，MS2-TOTAL (QYT 100)

測定方法：

使用方法の動画：www.youtube.com/HygienaTV

Step 1 ：培養

培養手順を以下に示します。Step 1 の図も参照してください。

1. 試料を採取し MicroSnap Total 培養キット（パーツ番号 MS1-TOTAL）に入れます。
   試料を以下の手順で採取します：
   i. 表面を 10x10cm 拭き取るか、あるいは表面が平坦でない等それが困難な場合はできる限り多くふき取れるようにします。
   ii. 液体 ： 1ｍL の飲料または水の試料を MicroSnap Total 培養キットに直接加えます。
   iii. 食材 ： 適当な懸濁液を 1mL、例えば 10% w/v 食品ホモジネートを培養キットに直接加えます。食品ホモジネートの調製は、食品の原試料を 10g または 50g ひょう量して、希釈液（注: *AOAC PTM study* でバリデートされた *MRD : Maximum Recovery Diluent*）を 90mL または 450mL 入れたストマッカーバッグに添加する方法で行うものとします。試料の未知の汚染については、新たに 90ml の希釈液に 10%の 10ml を添加する方法で 1% および 0.1%と繰り返して、さらに多くの 10%以下の希釈系列を作製しなければなりません。複数の試料が必要であれば、引き続き原試料のバルクから新たに 10g または 50g を採取して段階希釈を繰り返します。複数試料は、得られた RLU 値により、それぞれ 10%, 1%, 0.1% 希釈液の一部から 1mL を 抜き取って調製することができます。
   注: 比較試験を実施する場合、異なる検査法の間で同等の結果を得るためには 10 分以内に全ての試料の試験を開始する必要があります．採取した試料は使用するまで 4°C で 2 日まで保存できますが、MicroSnap と比較法とで試料を検査する前に室温に戻しておく必要があります。
2. スワブをスワブチューブに戻し、再度装着します。キットの状態は最初に包装から取り出した時と同じような外観にしてください。
3. しっかりとチューブを持ち、上部のスナップバルブを親指と人差指で前後に折り曲げて培養キットをアクティベートします。
4. バルブとスワブチューブを互いに数 cm 離して内部の圧を下げ、バルブを絞って液体培地を全てスワブチューブの底に放出します。液体培地の大部分がスワブチューブの底にあることを確認してください。
5. スワブをスワブチューブに戻し、しっかり装着して確実に閉じます。
6. 試料と培養液が混ざるようにチューブをやさしく振ります。
7. 30±0.5℃で 7 時間± 10 分間培養します。

Step2：検出

検出の手順を以下に示します。Step2 の図も参照してください。Step2 を始める前に EnSURE ルミノメータを稼働させてください。場所がプログラムされている場合はテストする場所を選択してください。

1. MicroSnap Total 検出キット（パーツ番号

MS-TOTAL）を室温（22 – 26 °C で 10 分間）になじませます。手のひらで 5 回たたくか、一度強く下向きに振ってください。これは抽出溶剤をチューブの底部分へ集めるためです。

2. 培養済のサンプルを培養キットから検出キットに移します。培養キットのスワブはピペットとして使うことができます。
   i. 試料を混ぜ、バルブ中に液を吸い上げます。
   ii. 培養キットのスワブをチューブから取り出します。
   iii. バルブをねじって引き上げて、検出キットを開けます。手元に置いておきます。
      a. 検出キットのチューブ上部に培養キットのスワブチップを挿入し（約 1 インチまたは 3 cm)、培養キットのバルブを軽く絞って培養済試料を Fill line まで入れます。この際、Fill line より培養液を入れないようにしてください。これにより結果の値が左右します。
   iv. 培養キットに残っている培養済試料は追加試験のために残すこともできます。培養キットのキャップをして元通りにインキュベーターに戻してください。
   注*:* 同じ培養済試料で追加試験を実施する場合、同等の結果を得るためには *10* 分以内に全ての追加試験を実施する必要があります.
   v. 検出キットのキャップを元通りに閉めます。
3. しっかりとチューブを持ち、上部のスナップバルブを親指と人差指で前後に折り曲げ、検出キットをアクティベートします。全ての試薬をスワブチューブの底に放出するために、上部のスポイト状のキャップを 3 回絞ります。
4. チューブをやさしく振ります。
5. ただちに検出キットをルミノメータに挿入します。蓋を閉め、測定器を垂直に保持したまま“OK”ボタンを押して測定を開始します。15 秒のカウントダウンののちに結果が表示されます。
6. 測定結果は RLU（相対発光量）で表示されます。RLU 値に基づいた検査の合否判定しきい値を設定してご使用ください。RLU 値に対応する CFU レベルについては“結果の解釈”のセクションを参照してください。

検出限界:

検出限界とは、検査が正しく有効に実施された場合に食品の原試料で検出可能な生存している好気性菌の最低レベルです。検出可能な細菌の最低レベルは培養時間の延長とともに減少します。7 時間培養時の検出レベルは 10 CFU / mL で 8 時間培養時には 1 CFU / mL になります。この化学量論の継続は食品における細菌増殖の Baranyi- Roberts モデルと一致しています。7 時間培養時では、CFU と RLU の関係は 1 対 1 、または Y=X の関係に似ています。EnSURE で測定した場合の MicroSnap Total の 7 時間でのダイナミックレンジは、EnSURE で測定可能な RLU 値の実際の範囲と比例しています。下限である 10 RLU (7 時間培養時の<10 CFU/mL) は検査した滅菌済食品での自然のバックグラウンド値 (RLU の平均値 + 6 標準偏差)を基にしています。

表 1：7 時間培養時のダイナミックレンジ

サンプルのタイプ	CFU 範囲
環境表面	10-10,000 (CFU/スワブ)
液体 1mL	10-10,000 (CFU/mL)
固形物 10% w/v	100-50,000（CFU/g）

表 1 で詳細に示した範囲外の汚染がある食品については、以下の希釈系列を調製してルミノメータで測定する必要があります:

- 1,000 – 500,000 CFU 見当の 1% 懸濁液
- 10,000 – 5,000,000 CFU 見当の 0.1% 懸濁液
- 注: 複数濃度の希釈系列の検査で直線的な結果を得るには、全ての希釈液を用意して同時に検査を行う必要があります。

AOAC PTM バリデーション：

表 2：種々の食品原試料を用いた ISO 法との相関に関する AOAC PTM バリデーション

食品の原試料	ISO 法との相関(R^2)
生の牛ひき肉	0.771
生の鶏肉	0.969
レタス	0.948
生クリームケーキ	0.987
生乳	0.990

食品の原試料を生の状態で検査しました。菌の接種を行わずに測定を実施した結果、全ての試料が何れかの計数可能な範囲で示されました。このように低レベルであっても常に細菌が存在するため、実際の食品試料を真の陰性を調査する目的として使用することは困難です。100 CFU/g の検出下限は MicroSnap を 7 時間培養した場合に使用可能です。

この検査法は生菌数計測の比較参照法である ISO 4833:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C* (ISO 4833) (3) と良好な相関が認められました。

結果の解釈：

ルミノメータに表示される結果は相対発光量(RLU)です。数値化された光の強さは、検査時点での増殖している生菌から抽出された ATP 成分に比例します。この ATP 濃度は当初の細菌汚染と比例し、順次 Colony Forming Units (CFU)として表現されます。表 3 は 30 °C で 7 時間の培養を行った場合に限っての RLU 値と CFU 値の換算表を示しています。データは様々な食品について検査した社内試験および AOAC のバリデーション試験から引用しました。

表 3：30°C での RLU 値と CFU 値の換算表

RLU (EnSURE)	等価 CFU	
	サンプル 1mL 直接添加（or 表面ふき取り）	固形サンプルの 10%懸濁液
<10	<10	<100/g
<20	<20	<200/g
<30	<30	<300/g
<50	<50	<500/g
<100	<100	<1000/g
<1000	<1000	<10000/g
>5000	TNTC	TNTC

いくつかの希釈液を用意して汚染の検査を行う場合、結果の CFU 値は対応する希釈倍率によって CFU/g か mL を換算します。

校正と管理：

GLP に準拠した陽性対照および陰性対照の検査を推奨します。Hygiena 社は下記の対照品を提供しています:

・ Calibration Control Kit (パーツ番号 PCD4000)

保管方法と有効期限：

2～8℃の冷蔵下で約 12 ヶ月保管できます。詳しくはラベルの有効期限をチェックしてください。

処分の方法：

廃棄前に滅菌してください。MicroSnap キットはオートクレーブや 20%の漂白剤での 1 時間の処理で滅菌が可能です。その後に廃棄してください。また MicroSnap キットはバイオハザード廃棄物処理施設に廃棄することもできます。

安全と注意：

1. MicroSnap の構成部品は正しく使用されれば健康に対するリスクとはなりません。陽性が確認された使用済み試薬はバイオハザードとなり得るので、GLP や安全衛生の法令等に従い安全に処理されなければなりません。検出キットは使い捨てです。再使用しないでください。
2. 期限切れの試薬を使用しないでください。
3. 交叉汚染をさけるため、検査は無菌操作で行ってください。
4. 試料の希釈濃度をルミノメータのダイナミックレンジ内の適切なものとして下さい。
5. 用例に記載された適切な培養温度と時間で実施してください。
6. 複数濃度の希釈系列の検査で直線的な結果を得るには、全ての希釈液を用意して同時に検査を行う必要があります。
7. 同じ培養済試料で追加試験を実施する場合、同等の結果を得るためには 10 分以内に全ての追加試験を実施する必要があります.
8. 比較試験を実施する場合、検査法間で同等の結果を得るためには 10 分以内に全ての試料の試験を開始する必要があります.

免責事項：

1. MicroSnap キットはすべての食品製品、食品加工工程、検査プロトコル、またはすべての微生物の系統についてテストされているわけではありません。
2. ヒトや動物の診断にこの検査を使用しないでください。
3. 培地によって、培養される菌種、菌量は様々で一つとして同じ結果を与えるものはありません。また、試料採取方法や検査プロトコル、ハンドリングなどの外的要因によっても回収結果は影響されることがあります。

4. 検査方法がお客様の基準を満たすように、試料数や接種量など検査条件はお客様の責において適切に選択ください。
5. 検査者・作業者への適切な訓練をお客様の責において実施ください。

製造者/販売者責任：

本製品は他の培地と同様に、検査された食物、飲料や製造プロセスの品質を保証するものではありません。本製品の製造者(Hygiena International Ltd)または販売者(ニッタ株式会社)は、本製品の使用者またはその他の者に対し、本製品の使用によって直接、間接、偶発的、必然的に生じた如何なる損害、喪失について責任を負いません。製品に不具合が認められた場合に本製品の製造者または販売者が負う義務は、製品の交換、あるいはその裁量においての返金を限度とします。不具合が疑われる場合には発見から5日以内に販売者にご連絡・返品をお願いいたします。その他については販売者にお問い合わせください。

より詳細な情報については www.hygiena.com または www.nitta-monitoring.com をご覧いただくか、下記までご連絡下さい。

製造元：

Hygiena USA
Phone: 805.388.8007
Fax: 805.388.5531
Email:info@hygiena.com

Hygiena-International Ltd
Phone: +44(0)1923 818821
Fax: +44(0)1923 818825
Email:enquiries@hygiena.com

販売元：

ニッタ株式会社
クリーンエンジニアリング事業部
営業部　モニタリング営業課

[大阪本社]
TEL：06-6563-1235
FAX：06-6563-1265

[東京支店]
TEL：03-6744-2740
FAX：03-6744-2741

お問い合わせ：

MicroSnap™ Total
一般生菌迅速判定
必須パーツ
Step 1：MicroSnap Total 培養キット，MS1-TOTAL (QYT 100)
Step 2：MicroSnap Total 検出キット，MS2-TOTAL (QYT 100)

MicroSnap **Total**

Step: 1 環境表面ふき取り、液体、固体試料の培養

環境表面ふき取り　液体試料　固体試料

1

ⅰ．表面：10x10ｃｍを培養キットでふき取る。

または

ⅱ．液体試料：１mL の飲料または水等の液体試料を培養キットに直接加える。

または

ⅲ．固体試料：１mL の適切な濃度の懸濁液を培養キットに直接加える。

2

2. スナップバルブをスワブチューブに元通りに挿入する。

3

3. キットをアクティベートする。バルブを折り曲げてスナップバルブを折る。

4

4. バルブをチューブから数 cm 引き上げバルブを押し潰して培養液をチューブの底に落とす。バルブをチューブに戻す。培養液はチューブの底に落とすこと。

5

5. チューブを軽く振り液と試料を混ぜる。

6

6. 30±0.5°C で 7時間±10分間培養する。Step2に進む。

MicroSnap™ Total
一般生菌迅速判定
必須パーツ
Step 1：MicroSnap Total 培養キット，MS1-TOTAL (QYT 100)
Step 2：MicroSnap Total 検出キット，MS2-TOTAL (QYT 100)

Step: 2 検出/測定

1

1. 検出キットを室温に戻す。たたいて振り液をチューブの底に集める。

2

2. 培養済試料を無菌的に培養キットから検出キットに移す。

3

3. スナップバルブを折って検出キットをアクティベートする。バルブを絞って液体をチューブの底に落とす。液体がチューブの底にたまる。

4

4. アクティベート後、チューブを軽く振り試料と液体を混合する。

5

5. 検出キットをルミノメータに挿入し測定を開始する。

6

6. 測定結果の RLU を記録し、表 2 の換算表を元に判定する。

使用方法の動画：
www.youtube.com/HygienaTV