

使用方法

MicroSnap—Coliform and *E. coli*

部品番号

- MicroSnap 培養キット 環境表面、液体、食品サンプル用 (部品番号 : MS1-CEC)
- MicroSnap 培養液 液体試料フィルタろ過用 (部品番号 : MS1-CEC-BROTH-2ML)
- MicroSnap 大腸菌群(Coliform)培養キット (部品番号 : MS2-COLIFORM)
- MicroSnap 大腸菌(*E. coli*)検出キット (部品番号 : MS2-ECOLI)

説明/用途 :

MicroSnap は特定の微生物を検出および計測するための迅速生物発光法を用いた検査方法です。

MS2-COLIFORM および MS2-ECOLI での検査は8時間以内に大腸菌群と大腸菌を特異的に検出するよう構成されています。

検査は特異的増殖培地を含む培養キットと、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。Step 1 (培養キット) では細菌数を増加させるために試料を培養液で培養します。細菌数が増加するとともに、生物発光反応に必要な診断酵素 (beta-galactosidase および beta-glucuronidase) がより多く作り出されます。必要とされる感受性のレベルによって試料の培養時間が決定されます。培養後、少量の試料を検出キットに移します。Step 2 では、検出キットをアクティベートして 10 分間反応させます。この時間内において、光を作り出す診断酵素と特異的基質とが反応します。発光はルミノメータを用いて秒単位で測定します。光の強さは初菌数に直接比例します。

MicroSnap は環境表面や製品試料、水、その他、ろ過することができる液体に用いることができます。

MicroSnap は肉、日配、野菜、飲料水や清涼飲料のような主要食料品群を含む幅広い食品についてバリデートされています。

必要器材(同梱されていません) :

- 試料希釈液(例)
 - 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
- ユーザー選定のバリデートされた他の希釈液
- 0.45µm無菌フィルタと濾過装置(大量の液体サンプルの場合のみ)
- 37°C±1°Cの培養器
- ルミノメータ : EnSURE または SystemSURE Plus

測定手順 :

使用方法の動画 : www.youtube.com/HygieneTV

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。

環境表面と製品試料 :

- 1) 試料を採取し MicroSnap 培養キット (Part# : MS1-CEC) に入れます。
試料は次のいずれかの方法で採取します。
 - 1.1 表面拭き取り - 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。
 - 1.2 液体 - 1mL の飲料または水のサンプルを MicroSnap 培養キットに直接加えます。
 - 1.3 製品 - 1mL の 10% w/v 食品ホモジネートを培養キットに直接加えます。食品ホモジネートは工業的に推奨された希釈液を使い、微

使用方法**MicroSnap—Coliform and *E. coli***

生物学的に標準的な方法によるものとし
ます (例として AOAC のバリデーション試験
で用いられる 450ml の希釈液に 50g の試料
を添加します)。他の試料数についてはユー
ザー毎にバリデートを行ってください。

- 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) バルブを前後に折り曲げて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
分を完全にスワブチューブの底に落とします。バ
ルブをスワブチューブに戻し、キットを確実に閉
じます。
- 5) 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。
- 6) 37°C±0.5°Cで培養します。定量判定には 6 時間
培養します。陰陽性判定には 8 時間培養します。

大容量のフィルタろ過可能な液体試料 :

- 1) 100mL までの液体試料を採取し、フィルタ直径
25mm または 47mm の孔径 0.45um のメンブレ
ンフィルタでろ過します。
- 2) 試料をろ過したフィルタを無菌操作で取り外し、
47mm滅菌済ペトリ皿に入れます。
- 3) Enrichment Broth (MS1-CEC-BROTH-2ML)
の容器から培養液を無菌的にペトリ皿に加えます。
- 4) ペトリ皿を 37°±0.5°Cで培養します。定量判定に
は 6 時間培養します。陰陽性判定には 8 時間培養

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。

- 1) MicroSnap 大腸菌群(Coliform)検出キット、ある
いは大腸菌(*E. coli*)検出キットを、室温 (22 -
26 °C で 10 分間) になじませます。検出キット
で手のひらを 5 回たたくか、一度強く下向きに振
ってください。これはチューブ内部に拡散してい
る抽出溶剤をチューブの底に集めるためです。抽
出溶剤はチューブ内の液体と培養済試料がチュ
ーブ内でよく混和するために必要です。
- 2) 培養済試料を検出キットに移します。
 - 2.1 培養キットから無菌操作で試料の一定分量
(0.1mL または 3 滴が適量です) を取り出し
検出キットに移します。培養キットをスポイト
として用いることもできます。バルブに吸い上
げ吐き出しを繰り返して液を混合し、後にバルブ内
に吸い上げます。スワブをチューブから抜き、
慎重に 3 滴 (0.1mL) を検出キットの底部の
Fill line まで入れます。培養済試料の残りは追
加テスト用に培養キットに戻します。
 - 2.2 フィルタろ過した試料の場合はペトリ皿から培
養済み培養液 0.1mL を無菌的にピペットで吸
い上げ検出キットに加えます。
- 3) バルブを折り曲げてスナップバルブを壊し、検出
キットをアクティベートします。試薬を放出する
ためにバルブを 3 回絞ります。
- 4) 混合するため軽く 2 回振ります。
- 5) 検出キットを 10 分間 (±0.2 分) 、37°±0.5°C
で反応させます。

使用方法

MicroSnap—Coliform and *E. coli*

- 6) 10 分間反応させた後、キットを丸ごとルミノメータに入れ、蓋を閉めます。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。
- 7) 測定結果は RLU (相対発光量) で表示されます。お使いの機器に RLU 値に基づいた検査の可否判定しきい値を設定してご使用ください。CFU レベルとの相関関係“結果の解釈”のセクションを参照してください。

追加/確認検査 :

MicroSnap 大腸菌群 (Coliform) 検査で陽性の結果が出た試料は、更に大腸菌 (*E. coli*) の陰陽性判定のために前述の MS2-ECOLI 検出キットを使用して “Step 2: 検出”の手順を繰り返します。MicroSnap 大腸菌 (*E. coli*) 検出キットを用いた大腸菌 (*E. coli*) の検査だけを行った場合には、その後さらなる確認検査を実施する必要があります。

結果の解釈 :

結果は相対発光量 (RLU) として表示されます。表 1 に RLU 値に相当する colony forming unit (CFU) 値を示します。これにより本来の試料中に何 CFU の大腸菌群または大腸菌が存在するかを知ることができます。

この検査用に認められている Hygiena 社製の 2 機種ルミノメータはそれぞれ異なる動作特性と感度を持っており、そのため RLU 値のスケールは機種ごとに異なります (表 1 を参照してください)。System SURE Plus と EnSURE は 4 桁の RLU 値まで表示でき、10,000 以上の値は範囲外となります。

定量的/計数的測定 :

培養時間 : 6 時間

測定結果の RLU 値は接種時に比例します。表 1 を用いて、使用したルミノメータにおける RLU 測定値と比較してください。このデータは AOAC Validation study 2013 によるものです。従来法と MicroSnap による検査は 92%以上一致します。

表 1: 大腸菌・大腸菌群の CFU 値と MicroSnap RLU 値の関係

CFU 推定値	RLU 相当値	
	SystemSURE Plus	EnSURE
<10	< 2	< 2
<20	< 3	< 4
<50	< 6	< 7
<100	< 8	< 12
<200	< 12	< 20
<500	< 25	< 35
<1000	< 50	< 60
<5000	< 85	< 180
<10,000	< 150	< 300

定性/陰陽性判定測定 :

培養時間 : 8 時間

定性的測定 (陰陽性判定) は通常 10 CFU /g 以下の食物、または 1 CFU /100mL 以下の水のような低い汚染レベルの検出・判定に使われます。試料調製後、培養ステップへの接種試料が菌を全く含まないか、1 CFU 以上の菌を含むかを判定します。

37°Cで 8 時間培養した場合、1 CFU の種菌は検知するに十分な酵素反応を起こします。陰陽性判定の判定値は、AOAC Validation study において 405 Coliform と 315 *E.coli* を接種した食品試料を用いて算出しま

使用方法

MicroSnap—Coliform and *E. coli*

した。RLU 値による陰陽性判定の判定しきい値は以下の表 2 を参照ください。

表 2: 定性的測定のためのしきい値

判定結果	SystemSURE Plus	EnSURE
陰性	0	0
疑陽性	1	1
陽性	≥2	≥2

ほとんどの大腸菌群および大腸菌は低い種菌量や汚染レベルであっても8時間培養で十分な酵素活性を産生でき、検出が可能です。8時間以上の培養は検出限界あるいは検出感度には特に影響しません。

結果が小さい RLU 値を示した場合（例えば3あるいは4）は汚染のレベルが低いことを示します。RLU 値は37℃での検出キット（Step2）の反応時間が10分以上に延長すると徐々に増加します。反対に、汚染のない試料では RLU 値は増加しません（表 3 を参照してください）。これは結果の解釈により大きな保証を与えます。

表 3 : 反応時間の延長

ルミノメータ	1 回目結果 (10 分培養後)	2 回目結果 (延長培養後)	判定結果
EnSURE	4RLU	4RLU	陰性
EnSURE	4RLU	10RLU	陽性

AOAC 認証 :

表 4 に示される食品に対する MicroSnap を用いた検査方法がバリデートされ、AOAC により認証されています。

表 4: バリデートされた食品

大腸菌群 (Coliform) 6 時間培養	大腸菌(<i>E. coli</i>) 6 時間培養	大腸菌群 (Coliform) 8 時間培養	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 8 時間培養
牛ひき肉	牛ひき肉	牛ひき肉	牛ひき肉
BLT サンドイッチ	BLT サンドイッチ	-	BLT サンドイッチ
生タラ	生タラ	生タラ	生タラ
調理済み鶏肉	調理済み鶏肉	調理済み鶏肉	調理済み鶏肉
レタス	レタス	-	-
牛乳	牛乳	牛乳	牛乳
生鶏肉	生鶏肉	生鶏肉	生鶏肉
RTE ハム	RTE ハム	-	-
生エビ	生エビ	生エビ	生エビ
ミネラル ウォーター	ミネラル ウォーター	ミネラル ウォーター	-

包括性/排他性 :

包括性および排他性試験のデータは検査の性能が微生物検出性を基礎としたものであることを証明しています。包括性とは大腸菌群および大腸菌に属する細菌を検出する能力を表します。排他性とは、大腸菌群や大腸菌ではない他の細菌について、それらが高レベルの汚染であっても排除して検出しない能力を表します。MicroSnap は要求された標的レベルである 1000 CFU/mL についてすべての細菌を正確に測定します。包括性および排他性両者の微生物の全リストについては Hygiena 社から入手することができます。また MicroSnap は 10-100 CFU/mL という低レベルについても非常に高い検出確率を示します。(以下の表 5 を参照してください。) 感度 (<95%) は最少接種レベルを反映した値であり、検出対象細菌の検出不能性を示すものではありません。

使用方法
MicroSnap—Coliform and *E. coli*
表 5: 低レベル汚染の検出確率(10 – 100CFU / mL)

	大腸菌群(Coliform) 8 時間培養 (%)		大腸菌(<i>E.coli</i>) 8 時間培養 (%)	
	SystemSURE Plus ^A	EnSURE ^B	SystemSURE Plus ^A	EnSURE ^B
	感度	94	96	88
特異性	100	100	100	100
陽性的中率 (PPV)	100	100	100	100
陰性的中率 (NPV)	92	100	92	100
精度	96	100	95	100

A- AOAC validation study における SystemSURE Plus の取得データに基づく (n = 30 Coliform (*E. coli* を除く), n = 30 *E. coli*)

B- Campden Food Laboratories での独自研究で得られた EnSURE の包括性データに基づく (n=45 Coliforms)

管理：

GLP に準拠した陰性対照、陽性対照での管理を行うことを推奨します。Hygiena 社は次の対照品を提供しています。

- Calibration Control Kit
(パーツ番号 PCD4000)
- Coliform Positive Controls
(パーツ番号 MS-PC-COLIFORM)

食品試料の影響：

特定の酵素群を元来高いレベルで含有するある種の食品は、高いレベルのバックグラウンドノイズを含み、偽陽性と誤判定されることがあります (例えば、いくつかの発酵乳製品やある種の緑葉サラダ野菜)。しかしこれらが試験の性能を阻害することはなく、低レベルの大腸菌群および大腸菌であっても高いバックグラウンドノイズの上に検出されます。これらの食品に

ついては、Step2 での反応時間の前後で Step2 による検出を行ってバックグラウンドレベルをまず確認しておくことをお勧めします。偽陽性を検出してしまったことを防ぐため、上昇したバックグラウンドレベルに応じて、表 1 や 2 に示される最小限の検出しきい値を調整してください。しかし、これはあくまで注意喚起であり、ほとんどの食品においてこのような問題が無いこともご理解ください。

希釈されていない牛乳のような濃く不透明な試料は濁りにより検出結果に影響を与えることがあります。そのため、さらに試料の調製や検査のバリデーションが必要になることもあります。

Shigella sonnei 株の一部は時として偽陽性反応を示すことがあり、これは発色基質を含む培地においても同様で、診断原理上の限界でもあります。同様に *Hafnia alvei* 株も検出することができません。

安全と注意：

MicroSnap 試薬の構成部品は正しく使用す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。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。

1. 試薬は使い捨てです。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. 検査に応じた適切な培養温度と時間で実施ください

使用方法**MicroSnap—Coliform and *E. coli*****保存方法と期限：**

試薬の包装は 2–8℃で保存してください。

試薬の保存期限は 12 か月です。有効期限は試薬に記載されています。

警告と免責事項：

1. MicroSnap キットは、すべての食物製品、食品加工工程、検査プロトコル、またはすべての大腸菌群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ではありません。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. 他のあらゆる培地と同様に、MicroSnap はこの試薬で検査された製品の品質を保証するものではありません。
6. 検査者・作業員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。

お問い合わせ：

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

Step:1 培養

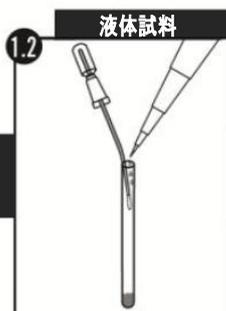
MicroSnap™

Step1: 環境表面ふき取り、液体、固体試料



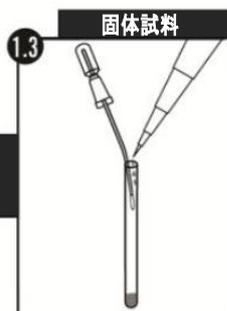
1.1. 表面：10x10 cm を MicroSnap 培養キットで拭き取る。

または

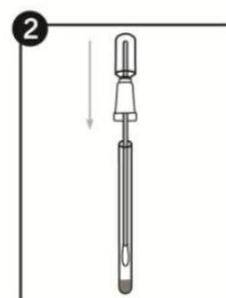


1.2. 液体試料：1 mL の飲料または水等の液体試料を MicroSnap 培養キットに直接加える。

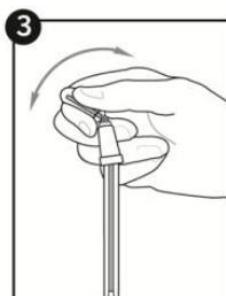
または



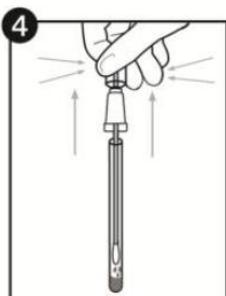
1.3. 固体試料：1 mL の 10% w/v 懸濁液を MicroSnap 培養キットに直接加える。



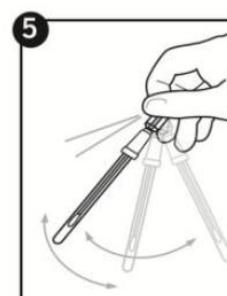
2. スナップバルブをスワブチューブに挿入する。



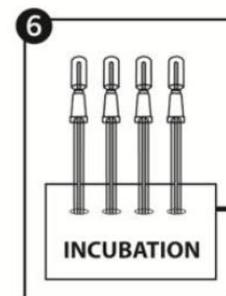
3. 試薬をアクティベートする。バルブを前後に折り曲げてスナップバルブを折る。



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。バルブの圧力を下げ (バルブはスポイトバルブのようにになっている) バルブをチューブに戻す。ほとんどの培養液はチューブの底に落とすこと。

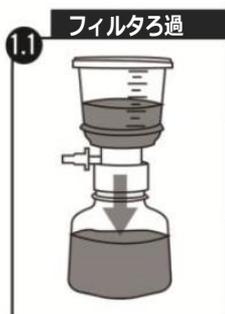


5. チューブを軽く振り液と試料を混ぜる。



6. 定量的測定には $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で 6 時間、定性的測定には 8 時間反応させる。これは培養した試料である。Step2 に進む。

Step1: 大容量のフィルタろ過可能な液体試料



または



1.1. フィルタろ過：試料を 0.45μm (ミクロン) フィルタでろ過する。

1.2. シリンジろ過：試料を 0.45μm (ミクロン) シリンジフィルタでろ過する。



2. ろ過後に無菌的にフィルタをはずして滅菌済ペトリ皿に置く。



3. 培養液 2mL をペトリ皿に添加する。



4. 定量的測定では 37°±0.5°C で 6 時間、定性的測定では 8 時間培養する。これは培養した試料である。Step2 に進む。

使用方法の動画：

www.youtube.com/HygienaTV

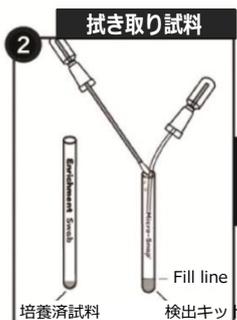
Step:2 検出

MicroSnap™

Step 2 : 検出



1. 大腸菌群(Coliform)検出キットを手の平で 5 回たいて振り液をチューブの底に集める。



2.1. **拭き取り試料** : 0.1mL (3 滴または Fill line まで) の培養済試料を無菌的に培養キットから大腸菌群(Coliform)検出キットに移す。

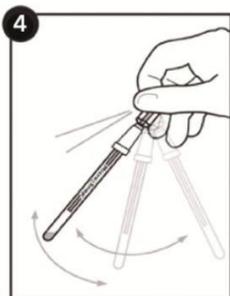
または



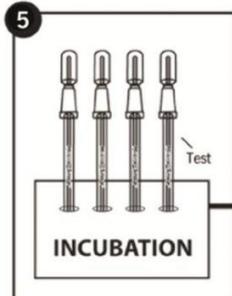
2.2. **ろ過試料** : ペトリ皿で培養した場合 0.1mL (3 滴または Fill line まで) の培養済試料をピペットでペトリ皿から大腸菌群(Coliform)検出キットに移す。



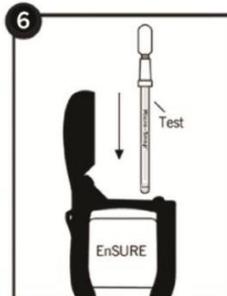
3. バルブを前後に折り曲げてスナップバルブを折り、大腸菌群(Coliform)検出キットをアクティベートする。バルブを 3 回絞って液体をチューブの底に落とす。



4. チューブを 2 秒振り、試料と液を混合する。



5. 大腸菌群(Coliform)検出キットを $37^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で 10 ± 0.2 分間反応させる。



6. 大腸菌群(Coliform)検出キットをルミノメータに挿入し測定を開始する。Table 1 を元に結果を判定する。



7. 大腸菌群の陽性結果が出た場合、大腸菌(*E.coli*)検出キットで大腸菌の検査をすることができる。測定手順は同じ培養済試料からの一部を用いて上記を繰り返す。