



## 製品情報

# 分子検出アッセイ2 - リステリア属菌

### 製品の概要および用途

Neogen®分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、Neogen®分子検出システムを用いて前培養した食品および環境検体中のリステリア属菌を迅速かつ特異的に検出するために使用します。

Neogen®分子検出アッセイは、増幅した菌を検出するために高い特異性と感度で核酸配列を迅速に増幅する遺伝子等温増幅法と、生物発光を組み合わせています。推定陽性結果はリアルタイムに表示され、陰性結果は検査が完了してから表示されます。結果が陽性と推定される場合は、任意の別の方法または行政の規制によって指定された通りに確認する必要があります<sup>(1,2,3)</sup>。

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、検査技術の訓練を受けた技術者が検査室環境で使用することを想定していません。Neogenは、食品または飲料以外の産業における本製品の使用に関しては検証していません。たとえば、Neogenは、本製品を水、医薬品、化粧品、臨床または動物検体の検査に使用することについては検証していません。Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、可能性のあるすべての検査プロトコル、あるいはすべての菌株について評価されたわけではありません。

**すべての検査法と同様に、増菌ブrossのメーカーや組成、品質などの要因が結果に影響する場合があります。**採取方法、検査プロトコル、検体の準備、取り扱い、および検査手技などの要因も結果に影響する場合があります。Neogenは、検査方法がお客様の基準を確実に満たすように、お客様の環境において、特定の食品または環境検体を用いて十分な数の検体で、濃縮培地を含む検査方法を評価することをお勧めします。NeogenはNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌を、デミフレーター基礎培地およびクエン酸鉄アンモニウムを含有するフレーター基礎培地を用いて評価しました。この基礎培地の典型的な組成は以下の通りです。

デミフレーターブrossベースの典型的な組成	(g/L)	フレーターブrossベースの典型的な組成	(g/L)
塩化ナトリウム	20 g	塩化ナトリウム	20 g
無水二塩基性リン酸ナトリウム*	9.6 g	無水二塩基性リン酸ナトリウム*	9.6 g
牛肉エキス	5.0 g	牛肉エキス	5.0 g
カゼイン胨臓消化物	5.0 g	カゼイン胨臓消化物	5.0 g
動物組織ペプシン消化物	5.0 g	動物組織ペプシン消化物	5.0 g
酵母エキス	5.0 g	酵母エキス	5.0 g
塩化リチウム	3.0 g	塩化リチウム	3.0 g
一塩基性リン酸カリウム	1.35 g	一塩基性リン酸カリウム	1.35 g
エスクリン	1.0 g	エスクリン	1.0 g
塩酸アクリフラビン	0.0125 g	塩酸アクリフラビン	0.025 g
ナリジクス酸	0.01 g	ナリジクス酸	0.02 g
* 代用物: 二塩基性リン酸ナトリウム二水和物	12.0 g		

### フレーターブross添加剤

(10 mLバイアル当たりの成分。基本ブross 1 Lに対し1バイアルを追加)

クエン酸鉄アンモニウム 0.5 g/10 mL

最終pH 25°Cで7.2 ± 0.2

Neogen®病原菌自動検出システムの装置は、アッセイのライシスステップ中に加熱処理を行った検体を測定することを目的としており、検体中に存在する微生物を溶菌するように設計されています。アッセイのライシスステップ中に適切な加熱処理を行っていない試料液は、潜在的バイオハザードとみなされる可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。

Neogenフードセーフティ部門は、設計と製造についてISO (国際標準化機構) 9001 認証を取得しています。

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌検査キットは、表1に記載のとおり96検体用となっています。

表1. Neogen 病原菌検出アッセイキットの内容

品目	特徴	数量	内容	コメント
Neogen®ライシス液 (LS溶液)	クリアチューブに入ったピンク色の液体	96検査分 (8連チューブ12セット)	チューブ1本につきLS 580 μL	ラック入り、調製済み
Neogen®分子検出アッセイ2 リステリア属菌試薬チューブ	ブルーチューブ	96検査分 (8連チューブ12セット)	凍結乾燥済み特異的増幅試薬および検出試薬	調整済み
予備キャップ	ブルーキャップ	96検体分 (8連キャップ12セット)		調整済み
Neogen® リージェントコントロール (RC)	フリップトップ式クリアチューブ	16検査分 (チューブ8本入り2パウチ)	凍結乾燥済みコントロールDNA、増幅試薬および検出試薬	調整済み

陰性コントロール (キットには付属しません) は、デミフレーターブロスなどの滅菌済増菌ブロスです。水は陰性コントロールとして使用しないでください。

## 安全性

Neogen病原菌自動検出システムおよびNeogen 分子検出アッセイ2 - リステリア モノサイトゲネス用の製品情報に記載のすべての安全情報を読み、理解し、遵守してください。また、今後参照できるように、この安全性指示を保管しておいてください。

△ **警告:** 警告は、それを避けなければ死亡または重篤な傷害ないし物的損害が発生しうる危険な状況を示します。

**注記:** 回避しないと、物的損害が起こり得る危険な状況を示します。

### ▲ 警告

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、ヒトまたは動物の病態診断に使用しないでください。

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌を用いた方法により、暴露されると妊婦の死産または死亡ならびに免疫不全状態の人の死亡を十分引き起こすレベルの *リステリア モノサイトゲネス* が生じることがあります。

検査実施担当者に適切な検査技術を身につけるように指導してください (例: GLP、ISO/IEC 17025<sup>(4)</sup>、ISO 7218<sup>(5)</sup>)。

汚染製品の出荷につながる偽陰性結果に伴うリスクを回避するために:

- プロトコルに従い、製品情報に記載のとおり検査を行ってください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、外箱表示および製品情報に記載のとおり保管してください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、必ず有効期限までに使用してください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、社内または第三者による検証を行った食品検体および環境検体に使用してください。
- Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は、社内または第三者による検証を行った表面、殺菌剤、プロトコル、菌株のみに使用してください。
- アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む環境検体については、試験前に1:2の希釈 (検体1に対して滅菌増菌ブロス1) を行ってください。別の方法としては、中和緩衝前増菌ブロス10 μLをNeogen ライシスチューブに滴下します。Neogen®検体採取製品のうち、アリルスルホン酸塩添加中和緩衝液を含む製品は以下の通りです。RS96010NB, RS9604NB, SSL10NB, SSL10NB2G, HS10NB, HS10NB2GおよびHS2410NB2G。

化学物質およびバイオハザードへの暴露に伴う危険を回避するために:

- *リステリア モノサイトゲネス*への暴露による母体回旋により発育中の胎児へのリスクが生じることを検査室の女性スタッフに伝えることを強く推奨します。
- 技能訓練を受けた検査実施担当者の管理下で、適切な設備のある検査室にて食中毒菌検査を行ってください。培養済み増菌ブロスおよび培養済み増菌ブロスと接触する機器または接触面には、人体に有害となりうる量の病原体が含まれている可能性があります。
- 試薬および汚染された検体を取り扱う際は、適切な保護衣、保護メガネの装着など、標準的な検査室の安全手順に常に従ってください。
- 増菌後のブロスや、増幅後の試薬チューブ内容物には触れないでください。
- 現行の業界基準に従って、増菌された検体を廃棄してください。
- アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。

**アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために:**

- 手袋を必ず着用してください(ユーザー保護と遺伝子混入防止のため)。

**環境汚染に伴う危険を回避するために:**

- 汚染廃棄物の廃棄は現行の業界基準に従ってください。

**高温の液体への暴露に伴う危険を回避するために:**

- ヒーターの温度設定を推奨温度以上にしないでください。
- 推奨される加熱時間を超えないでください。
- 適切な校正済みの温度計を使用して、Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサートの温度を確認してください(例:浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと)。温度計は、必ずNeogen 病原菌検出ヒートブロックインサートの指定の部位に設置してください。

**注記****アッセイ準備中の交差汚染に伴う危険を回避するために:**

- 試薬ベレットを水和する前に、手袋を交換してください。
- 滅菌済みのエアロゾルバリア材(フィルター付)、分子生物学グレードのピペットチップを使用してください。
- 検体ごとに新しいピペットチップを使用してください。
- GLP(医薬品安全性試験実施基準)に従って検体を増菌プロスからライシチューブに移してください。ピペッターの汚染を回避するため、中間的な移注ステップを追加することもできます。例えば、増菌された各検体を滅菌チューブに分注することができます。
- 利用可能な場合は、殺菌灯が装備された病原菌取扱エリアを使用してください。検査室の作業台および備品(ピペット、キャップ/デキャップツール等)は、水で1~5%(v/v)に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液を使用して定期的に除染してください。

**偽陽性の結果に伴う危険を回避するために:**

- 増幅後の試薬チューブは絶対に開けないでください。
- 汚染されたチューブは、常に、水で1~5%(v/v)に希釈した家庭用漂白液または同等品に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。
- 増幅後の試薬チューブは絶対にオートクレーブで加熱滅菌処理しないでください。

廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

具体的な用途や手順についてご質問がありましたら、当社のウェブサイト(www.neogen.com)をご覧ください。Neogen販売担当者または取り扱い販売店までお問い合わせください。

**お客様の使用責任**

お客様には、使用前に製品説明書および製品情報を熟知していただく責任があります。詳細につきましては、当社ウェブサイト [www.neogen.com](http://www.neogen.com) をご覧ください。担当のNeogen販売担当者または販売店にお問い合わせください。

検査方法を選択する際には、検体採取方法、検査プロトコル、検体調製、取り扱い、および検査手技などの外的要因が結果に影響する可能性があることを認識することが重要です。

検査方法または製品を選択する際に、適切なマトリックスおよび菌株を用いて十分数の検体を評価して、選択した試験方法がお客様の基準を満たすことをお客様の責任でご確認ください。

また、検査方法および結果が顧客または供給業者の要件を満たしているかについても、事前にお客様の責任でご確認ください。

他の検査方法と同様に、Neogen フードセーフティ製品を用いて得られた結果は、検査対象としたマトリックスまたは工程の品質を保証するものではありません。

各種食品マトリックスの検査方法の評価にご利用いただくため、NeogenではNeogen® 病原菌検出マトリックスコントロールをご用意しました。必要に応じて、マトリックスコントロール(MC)を使用し、基質がNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の検査結果に影響を及ぼすかどうかをご確認ください。Neogenの検査法を採用する場合、または新規や由来の不明なマトリックス、あるいは原材料を加工したマトリックスや加工工程が変更されたマトリックスを検査する場合は、検証期間中に、マトリックスの標準となる複数の検体(由来の異なる検体)をご確認ください。

マトリックスは、成分や加工状態など固有の特性を備える製品の種類として定義されます。基質間の違いは、加工や外観(例:生か滅菌済みか、新鮮か乾物か、等)の違いに起因する作用と同じように単純な場合があります。



## 保証の範囲 / 賠償の制限

個々の製品パッケージの限定保証条項に明示されている場合を除き、NEOGENは明示または黙示を問わず、製品または特定の目的への適合性に関する保証を含むがこれに限定されない、いかなる種類の保証も負いかねます。Neogen食品衛生管理製品部門の製品に欠陥があった場合、Neogenまたは指定販売店で交換あるいは製品購入価格の払い戻しをいたします。対応は上記のみとさせていただきます。ご不明な点がございましたら、Neogenの担当者またはNeogenの正規卸売業者にお問い合わせください。

## Neogenの保証責任範囲

NEOGENは、直接的、間接的、特殊なもの、偶発的または必然的であるかを問わず、利益損失を含むがこれに限定されないあらゆる損失または損害に対しての責任を負わないものとします。いかなる場合も、いかなる法的理論の下でも、Neogenの保証責任範囲は、欠陥と申し立てられた製品の購入金額を超えないものとします。

## 保管と廃棄

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は2~8°Cで保管し、冷凍しないでください。冷暗所で保管してください。キット開封後は、ホイルパウチが破損していないことを確認してください。パウチが破損している場合は、使用しないでください。開封後、使用しない試薬チューブは、凍結乾燥試薬の安定性を保つため、乾燥剤と共に再密封可能なパウチ内に必ず保管してください。再密封したパウチは2~8°Cで、60日間保存することができます。

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌は必ず使用期限までに使用してください。使用期限とロット番号は箱の外側のラベルに記載しています。使用後、増菌培地およびNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌には病原性の物質が含まれている可能性があります。検査終了後は、汚染廃棄物に関する現行の業界基準に従って廃棄してください。廃棄に関する詳細および行政の規制については、安全データシートをご参照ください。

## 使用方法

すべての指示に、注意深く従ってください。従わない場合、正確な結果が得られないことがあります。

検査室の作業台および備品（ピペット、キャップ / デキャップツール等）は、水で1~5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液またはDNA除去用液を使用して定期的に除染してください。

ユーザーは、「Neogen分子検出システムの据付時適格性 (IQ) / 運転時適格性 (OQ) プロトコルと手順」<sup>(6)</sup>に記載のとおり、Neogen分子検出システムのオペレーター資格トレーニングを受講する必要があります。

具体的な要件については、「バリデーション済みメソッドに関する具体的な指示」の項を参照してください。

表3. AOAC® *Official Method of Analysis*<sup>SM</sup> 2016.07およびAOAC® *Performance Tested Method*<sup>SM</sup> Certificate #111501に従う前増菌プロトコル。

表4. NF Validation 認定証3M 01/14-05/16に従う前増菌プロトコル。

## 検体増菌

表2、3、4に、食品および環境検体の増菌に関するガイダンスを示します。この検査法がおお客様の基準に合致するかを確かめるため、別の採取プロトコルまたは希釈率で事前にご確認いただき、お客様の責任で使用の可否をご判断ください。

## 食品

1. デミフレーザーブロス前増菌ブロス（クエン酸鉄アンモニウムを含む）を検査室の周囲の温度と平衡させてください。
2. 表2、3、4に従って、前増菌ブロスと検体を無菌的に混合します。すべての肉検体および微粒子を多く含む検体に関しては、フィルター付きホモジナイザーバッグの使用を推奨します。
3. ブレンダー、混合装置またはハンドミキサーで2 ± 0.2分ホモジナイズします。表2、3、4に従って、37 ± 1°Cで培養します。
4. 生の乳製品については（表2、4を参照）、一次前増菌物0.1 mLを10 mLのフレーザーブロスに移します。37 ± 1°Cで20~24時間培養します。

## 環境検体

殺菌剤の効果を不活性化するために、検体採取装置として、中和溶液を染み込ませたスポンジを使用できます。Neogenは、殺菌剤不使用のセルローススポンジを使用することを推奨します。中和溶液には、デイエングレイ (D/E) 中和ブロスまたはリージンブロスを使用できます。採取後は、作業領域を殺菌することを推奨します。

**警告:** アリルスルホン酸複合体をスポンジの水和溶液として含む中和バッファーの使用を選択する場合には、汚染された製品の在庫につながる偽陰性の伴うリスクを回避するために、検査を行う前に増菌環境検体の1:2の希釈液（検体1に対し滅菌増菌ブロス1）を行う必要があります。別の方法としては、中和緩衝前増菌ブロス10 µL Neogenライシスチューブに滴下します。

表面上の病原体の有無を確認するための検体採取部分の推奨サイズは、100 cm<sup>2</sup> (10 cm x 10 cmまたは4 in x 4 in) です。スポンジで検体採取する場合には、採取部分全体をスポンジで2方向に拭くか（左から右、次に上向きから下向きに）、検査室の現行のプロトコルまたはFDA BAM<sup>(1)</sup>、USDA FSIS MLG<sup>(2)</sup>またはISO 18593<sup>(7)</sup>に従って環境検体を採取します。

1. デミフレーザーブロス前増菌ブロス(クエン酸鉄アンモニウムを含む)を検査室の周囲の温度と平衡させてください。
2. 表2、3、4に従って、前増菌ブロスと検体を無菌的に混合します。
3. ブレンダー、混合装置、手作業またはボルテックスで $2 \pm 0.2$ 分ホモジナイズします。表2、3、4に従って、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で24～30時間培養します。

表2: 必要に応じてデミフレーザー基礎培地<sup>(a)</sup> およびフレーザー基礎培地<sup>(a)</sup> を使用して $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で実施する一般増菌プロトコル。

検体マトリックス	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	増菌温度 ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )	前増菌時間 (時間)
熱処理済み、調理済みまたは塩漬けした肉、鶏肉、魚介類	25 g	225	37	24～30
熱処理済み/低温殺菌済み乳製品				
果実および野菜				
多成分食品				
環境検体	スポンジ1個	100または225	37	24～30
	スワブ1本	10	37	24～30
生の肉、鶏肉、魚介類	25 g	475	37	28～32

検体マトリックス	一次前増菌(デミフレーザーブロス) <sup>(a)</sup>				二次前増菌(フレーザーブロス) <sup>(a)</sup>			検体の分析量 <sup>(b)</sup>
	検体量	前増菌ブロス量 (mL)	増菌温度 ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )	前増菌時間 (時間)	検体量	増菌温度 ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )	前増菌時間 (時間)	
生の乳製品	25 g	225	37	20～24	0.1 mLを10 mLのフレーザーブロスに滴下	37	20～24	10 $\mu\text{L}$

(a) 一次または二次前増菌中に、デミフレーザーブロスおよびフレーザーブロスに必ずフレーザーブロス添加剤(クエン酸鉄アンモニウム)を添加します。

(b) Neogenライシスチューブに移す検体量。ライシスセクションのステップ4.6を参照。

バリデーション済みメソッドに関する具体的な指示

AOAC® Official Method<sup>SM</sup> 2016.07

AOAC® Performance Tested Method<sup>SM</sup> #111501



AOAC Research Institute OMA<sup>SM</sup>およびPTM<sup>SM</sup>プログラムにおいて、Neogen分子検出アッセイ2 – リステリア属菌は、リステリア属菌の検出に有効な方法であることが確認されています。上記試験において検査の対象となったマトリックスを表3に掲載します。

表3. AOAC OMA<sup>SM</sup> 2016.07およびAOAC PTM<sup>SM</sup> Certificate #111501に従い、デミフレイザー基礎培地<sup>(a)</sup>を使用し37 ± 1°Cで実施する増菌プロトコル。

検体マトリックス		検体量	前増菌ブロス量 (mL)	前増菌時間 (時間)
ビーフホットドッグ、ケソフレスコ、バニラアイスクリーム、乳脂肪4%のカッテージチーズ、3%のチョコレート入り全乳、ロメイレンタス、袋入り生ホウレンソウ、冷燻サーモン		25 g	225	24~30
生鶏肉		25 g	475	28~32
ターキー総菜		125 g	1125	24~30
マスクメロン <sup>(b)</sup>		ホールメロン	メロンが浮かぶ十分な量	26~30
容器 材質	ステンレススチール	スポンジ1個	225	24~30
	密封コンクリート	スポンジ1個	100	24~30
	プラスチック <sup>(c)</sup>	スワブ1本	10	24~30

特に記載がない限り、AOACバリデーションに使用した検体はすべてストマッキングによりホモジナイズしました。

- (a) 一次または二次前増菌中に、デミフレイザーブロスおよびフレイザーブロスに必ずフレイザーブロス添加剤(クエン酸鉄アンモニウム)を添加します。
- (b) ハンドミキサーで検体をホモジナイズします。
- (c) ボルテックスにかけて検体をホモジナイズします。

AFNOR CertificationによるNF Validation



3M 01/14-05/16

ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS

<http://nf-validation.afnor.org/en>

有効性の終了についての詳細は、上記のウェブサイト上で入手できるNF VALIDATION認定証を参照してください。

NF VALIDATIONにより認証された方法は、ISO 11290-1<sup>(3)</sup>よりもISO 16140-2<sup>(8)</sup>に準拠しています

バリデーションの適応範囲: すべての人用食品検体および環境検体(一次生産サンプルを除く)

検体の調製: 検体はISO 11290-1<sup>(3)</sup>およびISO 6887<sup>(9)</sup>に従って調製してください

ソフトウェアバージョン: 認定証を参照してください

表4. NF VALIDATIONにより認証されたメソッド3M 01/14-05/16 (必要に応じてデミフレーター基礎培地<sup>(a)</sup>およびフレーター培地<sup>(a)</sup>を使用して37 ± 1 °Cで実施)に従う増菌プロトコル。

一般プロトコル	検体量	前増菌プロス量 (mL)	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量 <sup>(b)</sup>	許容される中断ポイント
すべての食品サンプル(生肉、生の魚介類、生の乳製品を除く)	25 g	225	37	24~30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>デミフレータープロス、最長72時間</li> <li>-20°Cでライセート</li> <li>4°Cで最長72時間ライセート</li> </ul>
環境検体	25 gスワブ1本 またはワイプ1枚	225	37	24~30	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>-20°Cでライセート</li> </ul>
具体的なプロトコル1	検体量	前増菌プロス量 (mL)	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量 <sup>(b)</sup>	許容される中断ポイント
生肉および生の魚介類	25 g	475	37	28~32	20 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>デミフレータープロス、最長72時間</li> <li>-20°Cでライセート</li> <li>4°Cで最長72時間ライセート</li> </ul>

具体的なプロトコル2	一次前増菌(デミフレータープロス) <sup>(a)</sup>				二次前増菌(フレータープロス) <sup>(a)</sup>				許容される中断ポイント
	検体量	前増菌プロス量 (mL)	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間 (時間)	検体量	増菌温度 (± 1°C)	前増菌時間 (時間)	検体の分析量 <sup>(b)</sup>	
生の乳製品	25 g	225	37	20~24	0.1 mLを10 mLのフレータープロスに滴下	37	20~24	10 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>フレータープロス、最長72時間</li> <li>-20°Cでライセート</li> </ul>

(a) 一次または二次前増菌中に、デミフレータープロスおよびフレータープロスに必ずフレータープロス添加剤(クエン酸鉄アンモニウム)を添加します。

(b) Neogenライシスチューブに移す検体量。ライシスセクションのステップ4.6を参照。

注: 25 gを超える検体は、NF Validation検査で評価されていません。

### Neogen® 病原菌検出スピードローダートレイ

1. 水で1~5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液で湿らせた布を使ってNeogen® 病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
2. 水でNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを濯ぎます。
3. 使い捨てペーパータオルでNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを拭きます。
4. 使用前に、Neogen 病原菌検出スピードローダートレイが乾燥していることを確認してください。

### Neogen® 病原菌検出チルブロックインサート

Neogen® 病原菌検出チルブロックインサートを作業台の上に直に置きます。チルブロックは検査室の室温 (20~25°C) で使用します。

### Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサート

Neogen® 病原菌検出ヒートブロックインサートをドライダブルブロックインサートヒーターユニットに入れます。ドライブロックヒーターユニットをオンにして、温度を100 ± 1°Cに設定します。Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートが設定温度に達したら、温度を保持します。

**注:**使用するヒーターユニットによっては、Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートが設定温度に達するまでに約30分かかります。適切な校正済みの温度計 (例:浸線付温度計またはデジタル熱電対温度計。全浸没温度計は使用しないこと) を指定の部位に設置し、Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートが100 ± 1°Cであることを確認します。

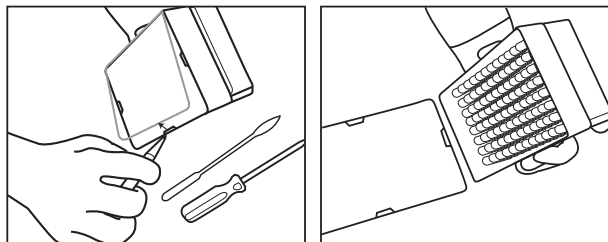
### Neogen®病原菌自動検出システム用の準備

1. Neogen®病原菌自動検出システム用ソフトウェアを起動してログインします。お使いのソフトウェアが最新バージョンであるかどうかを確認するには、Neogen食品衛生管理製品の営業担当者までお問い合わせください。
2. Neogen 病原菌自動検出システムの装置の電源を入れます。
3. 各検体のデータを含む検出結果を作成または編集します。詳細については、Neogen 病原菌自動検出システムユーザーマニュアルを参照してください。

**注:**Neogen 病原菌自動検出システムは、反応チューブと共にNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを入れる前に、スタンバイ状態になっている必要があります。この加熱ステップには約20分かかり、この間、装置のステータスバーがオレンジ色に点灯します。装置の準備ができると、ステータスバーは緑色に変わります。

### ライシス

Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートに入れる前に、ドライバーまたはスパテルでNeogenライシスチューブの底部をドライバーまたはヘラで取り外します。



1. Neogenライシスチューブは、ラックに一晚 (16-18時間) 静置して、室温 (20-25°C) に戻します。Neogenライシスチューブを室温に戻す別の方法としては、Neogenライシスチューブを作業台の上に2時間以上静置するか、Neogenライシスチューブを37 ± 1°Cの培養器内で1時間保温するか、Neogenライシスチューブをドライダブルブロックヒーターに入れて100 ± 1°Cで30秒間加熱します。
2. キャップを閉めた状態のライシスチューブを反転させて中の液を混合させます。4時間以内に次のステップに進みます。
3. インキュベータから前増菌ブロスを取り出します。
4. 各検体および陰性コントロール (NC) 検体 (滅菌前増菌ブロス) ごとにNeogenライシスチューブ1本が必要です。
  - 4.1 Neogenライシスチューブのストリップは、必要なNeogenライシスチューブ数分にカットすることができます。各Neogenライシスチューブ数または8連チューブのストリップ数を選択してください。Neogenライシスチューブを空のラックに置きます。
  - 4.2 交差汚染を回避するため、Neogenライシスチューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。

4.3 以下に記載のとおり、増菌した検液をNeogenライシチューブに滴下します。

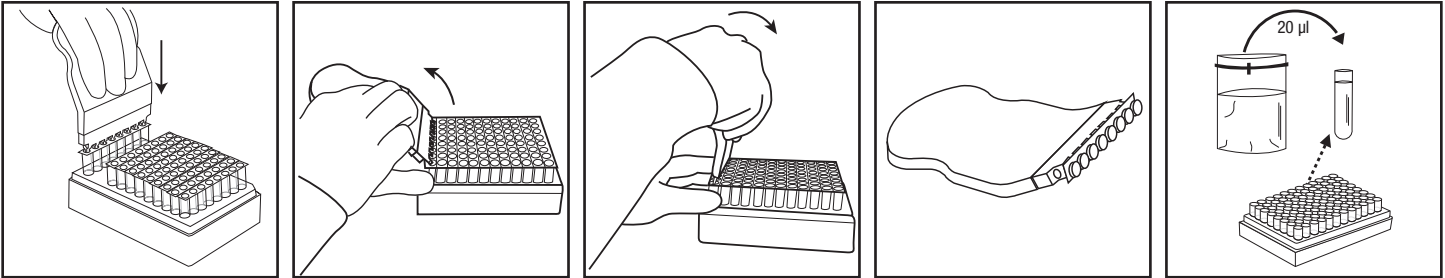
**まず、前増菌した各検体を各Neogenライシチューブに移します。最後にNCを移します。**

4.4 Neogen®分子検出キャップ / デキャップツール – ライシス、Neogenライシチューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。

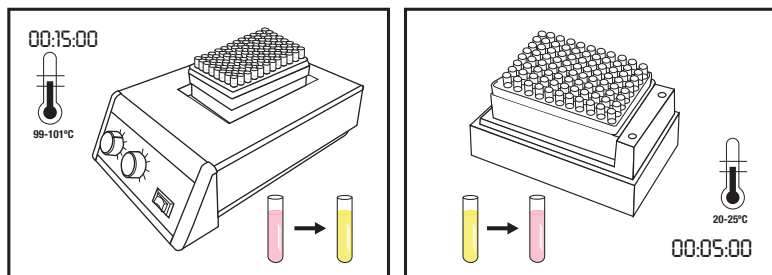
4.5 Neogenライシチューブのキャップを廃棄します。ライセートを再検査用に保存する場合は、キャップを清潔な容器に入れておき、ライシス後に再度キャップをはめます。

4.5.1 保存したライセートの処理については、付録Aを参照してください。

4.6 プロトコルの表2、3、4に他の規定がない限り、検体20 µLをNeogenライシチューブに移します(生の乳製品の場合、または環境検体を中和緩衝液とともに使用する場合などには10 µLを滴下します)。



5. すべての検体がストリップの対応するNeogenライシチューブに添加されるまで、ステップ4.4~4.6を繰り返します。
6. すべての検体を移したら、20 µLのNC(デミフレーザーブロスなどの滅菌前増菌ブロス)をNeogenライシチューブに移します。水は陰性コントロールとして使用しないでください。
7. Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサートの温度が $100 \pm 1^\circ\text{C}$ であることを確認してください。
8. Neogen 病原菌検出ヒートブロックインサート内にカバーを外したNeogenライシチューブブラックを入れて、 $15 \pm 1$ 分間加熱します。加熱中、Neogenライシ液はピンク色(低温)から黄色(高温)に変色します。
  - 8.1 アッセイのライシスステップ中に適切な熱処理を行っていない検体は、潜在的バイオハザードとみなされる可能性がありますので、Neogen 病原菌自動検出システムの装置内には入れないでください。
9. ヒートブロックからカバーを外したNeogenライシチューブブラックを取り出し、Neogen 病原菌検出チルブロックインサート内で5分間以上(最大10分間)冷却します。室温で使用したNeogen 病原菌検出チルブロックインサートは検査室の作業台の上に置いてください。冷却されると、ライシス液はピンク色に戻ります。
10. Neogen 病原菌検出チルブロックインサートからNeogenライシチューブブラックを取り出します。



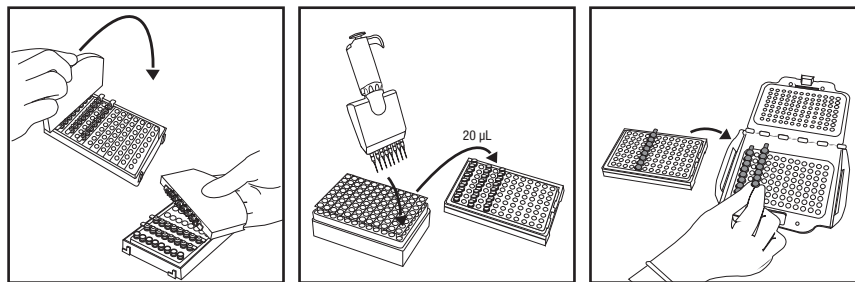
## 増幅

1. 検体およびNCのそれぞれにつきNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブ1本が必要です。
  - 1.1 試薬チューブのストリップは、必要な数に合わせて切り離すことができます。各Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブまたは8連チューブのストリップの数を選択してください。
  - 1.2 Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の試薬チューブを空のラックに置きます。
  - 1.3 チューブの底の試薬ペレットを撈拌しないでください。
2. Neogen リージェントコントロール (RC) チューブを1本選択して、ラックに置きます。
3. 交差汚染を回避するため、Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブのキャップは一度に1ストリップずつ外し、滴下ステップごとに新しいピペットチップを使用してください。

4. 下記のように、ライセートをNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の試薬チューブおよびNeogen リーエージェントコントロールチューブに移してください。

Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の各試薬チューブにまず各検体溶解物を滴下し、次にNCを滴下します。最後にRCチューブを水和します。

5. Neogen®分子検出キャップ / デキャップツール - 試薬用を使用して、Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の試薬チューブのキャップを一度に1ストリップずつ外します。キャップを廃棄します。
- 5.1 検液20  $\mu$ LをLS用チューブの液体の上部1/2 (沈澱物は避けてください) から取り、対応するNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブに分注します。ペレットが攪拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。
- 5.2 個々の検体ライセートをストリップ内の対応するNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブに添加するまで、ステップ5.1を繰り返します。
- 5.3 Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア試薬チューブに同梱の予備キャップで蓋をし、Neogen分子検出キャップ / デキャップツール - 試薬用の丸い側を使用して前後に圧をかけ、キャップをしっかりと締めます。
- 5.4 検査する全検体について、ステップ5.1および5.3を繰り返します。
- 5.5 すべての検体ライセートを滴下したら、ステップ5.1～5.3を繰り返してNCライセート20  $\mu$ LをNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブに滴下します。
- 5.6 Neogen リーエージェントコントロールチューブにNCライセート20  $\mu$ Lを滴下します。ペレットが攪拌されないよう、一定の角度で分注します。ピペット操作で5回静かに混合します。
6. 清潔な、殺菌済みNeogen 病原菌検出スピードローダートレイにキャップをしたチューブを装填します。Neogen 病原菌検出スピードローダートレイを閉めて、留めがねをかけます。



7. Neogen®病原菌自動検出システム用ソフトウェアで設定した検査内容を確認します。
8. ソフトウェアのスタートボタンをクリックして、使用する装置を選択します。選択した装置の蓋が自動的に開きます。
9. Neogen 病原菌自動検出システムの装置内にNeogen 病原菌検出スピードローダートレイを置き、蓋を閉めてアッセイをスタートします。結果は75分以内に表示されますが、陽性の場合にはさらに短時間で検出されることがあります。
10. アッセイ終了後、Neogen 病原菌検出スピードローダートレイをNeogen 病原菌自動検出システムの装置から取り出し、チューブは水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

**注記:** 交差汚染による偽陽性の危険を最小限に抑えるため、増幅DNAの入ったNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌試薬チューブは絶対に開けないでください。これには、Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌の試薬、Neogen リーエージェントコントロールチューブ、およびNeogen 病原菌検出マトリックスコントロールチューブが含まれます。密封されたチューブは、必ず水で1～5% (v/v) に希釈した家庭用漂白液または同等の溶液に1時間浸漬した後、アッセイの準備作業領域から隔離して、廃棄してください。

### 結果と解釈






核酸が増幅された菌の検出によって得られた光出力曲線がアルゴリズムによって解釈されます。結果はソフトウェアが自動的に解析し、結果に応じて色分けされます。陽性または陰性の結果は、多数の固有の曲線パラメータを解析することで決定されます。結果が陽性と推定される場合はリアルタイムでレポートされますが、陰性およびInspect (検証が必要な結果) の場合は、その検査が完了した後に表示されます。

陽性と推定される検体は、検査室の標準作業手順または適切な参照法<sup>(1,2,3)</sup>に従って確認する必要があります。まず、デミプレーザ基礎培地の前培養地を選択増菌培地に移し (該当する場合)、プレート接種したのち、適切な生化学的、血清学的手法を使用して単離菌を確認してください。

**注:**陰性検体がシステムとして0を返さない場合でも、Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌用増幅試薬は「バックグラウンド」相対発光量 (RLU) を有します。

異常な光出力がみられるなどの稀なケースについては、アルゴリズムにより「再検査してください」と表示されます。Neogen社は、「再検査」検体についてはアッセイを再度行うことを推奨します。その結果が再度再検査であった場合は、別の望ましい方法または行政の規制によって指定された通りに確認検査を行ってください。

**表5:** Neogen®病原菌自動検出システムソフトウェアが示す検体の結果の記号および解釈。

ウェルタイプ	ウェルの結果の記号	結果	判定
検体		陽性	検体は標的病原体について陽性と推定されます。
検体		陰性	検体は標的病原体について陰性と推定されます。
検体		阻害	検体マトリックスがアッセイを阻害しました。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		検証が必要	標的病原体の有無が確定できませんでした。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。
検体		エラー	生物発光が検出されませんでした。再検査が必要な場合があります。詳細については、トラブルシューティングセクションおよびアッセイキット製品情報を参照してください。

**NF VALIDATIONにより認証された方法に基づく結果の確認**

NF VALIDATIONに照らしてNeogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌により陽性と特定される検体はすべて、以下の検査のうちの一つにより確認する必要があります：

**オプション1:** ISO 11290-1<sup>(3)</sup>基準を使用し、デミフレーザー増菌から始める。

**オプション2:** NF VALIDATIONに認証を受けたリステリア属菌検出法の一部として、PALCAM寒天培地または発色性寒天培地で単離する。特徴的なコロニーが存在すればリステリア属菌の存在の確認に十分です。

**オプション3:** ISO 7218<sup>(5)</sup>基準に記載の通りに、選択寒天培地から単離したコロニーに対し核酸プローブを使用する (オプション1または2を参照)。

**オプション4:** NF VALIDATIONで認証済みのその他の方法を使用。この場合、Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌とは原理が異なる必要があります。この第2のバリデート済みの方法について記述した完全なプロトコルを必ず使用すること。確認開始に先行するすべてのステップが、両方の方法に共通している必要があります。

結果が一致しない場合 (Neogen分子検出アッセイ2 - リステリア属菌で陽性と推定されたが、上記の方法のひとつでは確認されない場合)、検査室は必要な手順に従って得られた結果の有効性を確認してください。

具体的な用途や手順についてご質問がありましたら、当社のウェブサイト ([www.neogen.com](http://www.neogen.com)) をご覧いただくか、Neogen販売担当者または取り扱い販売店までお問い合わせください。

**付録A. プロトコルの中断: 加熱処理済みライシスの保管と再検査。ライシスの2~8°Cで72時間保管は、乳製品および環境検体には適用しません。**

1. 加熱処理済みライセートを保管する場合、ライシチューブに清潔なキャップをはめます (「ライシス」セクション、4.5を参照)
2. 2~8°Cで最大72時間保管します。
3. 保管された検体を2-3回反転させて混合し、増幅用として準備します。
4. チューブのキャップを外します。
5. 混合したライシチューブをNeogen 病原菌検出ヒートブロックインサートに置き、100 ± 1°Cで5 ± 1分間加熱します。
6. ヒートブロックからNeogenライシチューブラックを取り外し、Neogen 病原菌検出チルブロックインサート内で5分以上 (最大10分間) 冷却します。
7. 上記の「増幅」セクションに詳述されているプロトコルを継続します。

**参考文献:**

1. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. October 31, 2017.
2. US Department of Agriculture (USDA) FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 8.11. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples. January 2, 2019.
3. NF EN ISO 11290-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method.
4. NF EN ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
5. NF EN ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
6. Neogen Installation Qualification (IQ) / Operational Qualification (OQ) Protocols and Instructions for Neogen Molecular Detection System.
7. NF EN ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling.
8. NF EN ISO 16140-2 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
9. NF EN ISO 6887. Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

**製品ラベル記号の説明**

[info.neogen.com/symbols](http://info.neogen.com/symbols)

# Neogen Food Safety

## Neogen Corporation

620 Leshar Place  
Lansing, MI 48912 USA  
Neogen.com

## Neogen Europe Ltd.

The Dairy School  
Auchincruive  
Ayr, KA6 5HU  
Scotland, UK

## Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray  
Co. Wicklow  
A98YV29, Ireland



## Neogen Corporation

620 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA  
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.

Neogen is a trademark of Neogen Corporation.

All other trademarks are the property of their respective companies.

© 2024, Neogen. Tous droits réservés.

Neogen est une marque de commerce de Neogen.

Toutes les autres marques de  
commerce appartiennent à leur propriétaire respectif.

FS00868A