

カネカ 食中毒菌検出キット(サルモネラ 一属/O4 群/O7 群/O9 群) version 2

注意

- 本品は研究用途としてのみ使用してください。ヒト、動物への医療、臨床診断等に使用しないでください。
- 本品の各種試薬は、本取扱説明書に記載する保存方法の内容を厳守して保存してください。保存する際にはコンタミネーションに注意してください。
- 本品の仕様は予告なく変更する場合があります。
- PCR 反応液の調製や反応に使用する器具や機器、試薬類(培地等を含む)は、本取扱説明書や各々の製造元・販売元が指定する使用方法に従って、使用してください。
- 本品によって得られた結果の判断や利用について、お客様の責任のもと実施してください。実施した結果、お客様に生じた損害や損失について当社はなんら責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順や各々の検体における検出結果の妥当性についてはお客様にて検証してください。

特徴・内容物

本品は、食中毒の原因菌として知られているサルモネラおよびサルモネラの O4 群、O7 群、O9 群を迅速・簡便に検出するキットです。本品には増幅酵素ミックス、プライマーミックス、テストストリップ(5ライン)、展開バッファーが含まれております。培地、DNA 抽出試薬(必要に応じて)は別途ご準備ください。

内容物	内容量(100テスト分)
増幅酵素ミックス	1 mL×1 本
プライマーミックス	0.8 mL×1 本
テストストリップ(5ライン)	50 本×2 ボトル
展開バッファー	16 mL×1 本
取扱説明書	1 部

保存方法／使用期限

- 保存方法
直射日光を避けて保存してください。
 - ・増幅酵素ミックス: -20℃保存
 - ・プライマーミックス: -20℃保存
 - ・テストストリップ(5ライン): 常温保存
 - ・展開バッファー: 常温保存

【注意事項】

- ・ テストストリップ(5ライン)は湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後も容器(乾燥剤含む)に入れ、蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿しないよう十分ご注意ください。
- ・ 増幅酵素ミックスおよびプライマーミックスについては、凍結・融解を繰り返すと検出性能が低下する恐れがありますので、1回で使い切れない場合は、できるだけ分注して保存し、凍結・融解の回数を極力少なくすることをお奨めします。

- 使用期限
本品外袋に記載しております。

使用方法

- 本品以外に検査に必要な器具・機器等
 1. マイクロピペット
 2. マイクロピペット用フィルター付きチップ
 3. サーマルサイクラー(推奨機器: Life ECO Thermal Cycler (Bioer Technology 社製))
 4. 1.5 mL チューブ
 5. 0.2 mL チューブ(PCR 用)
 6. 小型インキュベーター(1.5 mL 用、95℃以上の加熱が可能)
 7. 低速遠心機

■ 培養

下記の培養方法に従って、培養を行う。

検体種	培養方法(1段階目)	培養方法(2段階目)
液卵	25 g の液卵を 225 mL の緩衝ペプトン水 (BPW) に加えて、37°C で 19 時間以上培養する。	培養後の BPW 10 μL (上清) をブレインハートインフュージョン (BHI) 培地 500 μL に加えて、37°C で 3~4 時間培養する。
飼料	25 g の飼料 (飼料原料、配合飼料) を 250 mL の緩衝ペプトン水 (BPW) に加えて、37°C で 19 時間以上培養する。	
生肉	25 g の生肉を 225 mL の緩衝ペプトン水 (BPW) に加えて、37°C で 22 時間以上培養する。	—
糞便・胎便	25 g の糞便・胎便を 225 mL の緩衝ペプトン水 (BPW) に加えて、37°C で 22 時間以上培養する。	—
腸内スワブ (プロイラー)	腸内 (直腸) をスワブした綿棒 5 本を 10ml ハーナテトラチオン (HTT) 培地に入れて、42°C で 22 時間以上培養する。	—

■ 培養液からの DNA 抽出

下記の DNA 抽出方法に従って、培養液から DNA の抽出を行う。

検体種	DNA 抽出方法
液卵	<ul style="list-style-type: none"> 検査前に小型インキュベーターを事前に 98°C に設定して加熱しておく。 1.5 mL チューブにカネカ簡易 DNA 抽出キット ver.2 の Solution A を 100 μL ずつ分注しておく (検体数分)。そこに培養液 (上清) を 50 μL 添加する。 試料が入った 1.5 mL チューブを 98°C で 8 分間加熱する。 加熱終了後、1.5 mL チューブを室温に戻してから、カネカ簡易 DNA 抽出キット ver.2 の Solution B を 14 μL 添加し、混合する。 上清を DNA 抽出液として使用する。
飼料	
生肉	<ul style="list-style-type: none"> 検査前に小型インキュベーターを事前に 98°C に設定して加熱しておく。 1.5 mL チューブに 1xTE バッファーを 900 μL ずつ分注しておく (検体数分)。そこに培養液 (上清) を 100 μL 添加する。 試料の入った 1.5 mL チューブを 98°C で 10 分間加熱する。 上清を DNA 抽出液として使用する。
糞便・胎便	
腸内スワブ (プロイラー)	

■ PCR 反応液の調製

- 凍結しているプライマーミックス※、増幅酵素ミックス※を予め融解させる。
- 0.2 mL チューブにプライマーミックスを 8 μL と増幅酵素ミックス 10 μL を分注・混合して、マスターミックスを調製する。

※プライマーミックスと増幅酵素ミックスは、分注前にピペティングにて十分に混合してください。特に、増幅酵素ミックスは融解後に白沈が生じている場合、完全に溶解して、ご使用ください。

プライマーミックス	8 μL
増幅酵素ミックス	10 μL

- マスターミックスを調製した 0.2 mL チューブに DNA 抽出液 2 μL を添加する。
- 調製後、酵素の失活や非特異的な増幅反応を防ぐために、氷上等に置いてください。

■ PCR 反応

- サーマルサイクラーを起動し、0.2 mL チューブをセットした後、以下のプログラムで増幅反応を行う。

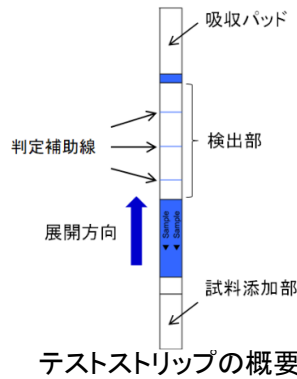
Step	温度/時間	サイクル数
Step 1	25°C / 10 min	1
Step 2	94 °C / 2 min	1
Step 3	94 °C / 5 sec →	35
	61 °C / 35 sec	
	72 °C / 20 sec	
Step 4	4 °C / (※)	1

【注意事項】

- PCR 反応液を調製後、すぐにサーマルサイクラーでの反応を行ってください。
- 反応液の調製時には滅菌済みのマイクロピペット用フィルター付きチップを使用してください。
- (※) 反応終了後、当日中に 0.2 mL チューブを取り出し、テストストリップによる検出を行ってください。

■ テストストリップによる検出

- ・ PCR 反応後の 0.2 mL チューブをサーマルサイクラーから取り出し、0.2 mL チューブの蓋を開け、展開バッファーを 160 μL 添加する。
- ・ テストストリップを 0.2 mL チューブに挿入し、テストストリップの試料添加部が反応液に浸るようにして、そのまま静置する。
- ・ 10 分後に、コントロールラインおよび各検出ラインを目視で判定する。

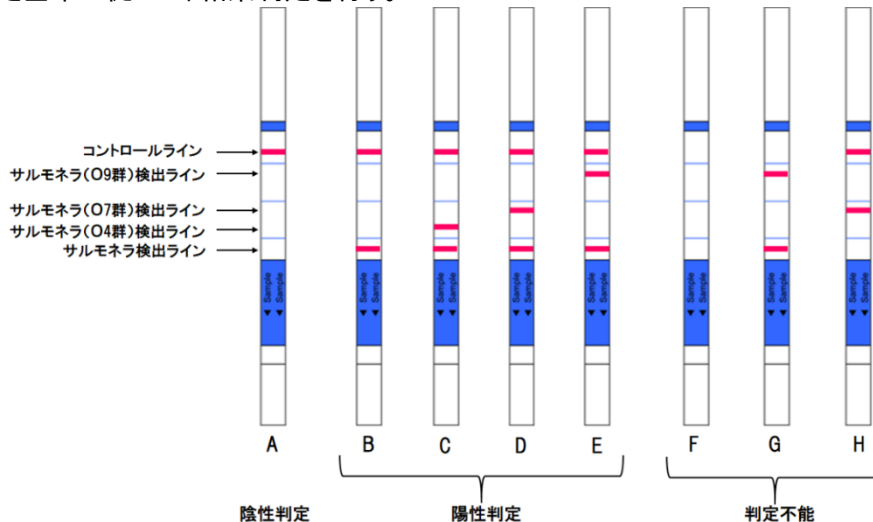


【注意事項】

- ・ 判定はテストストリップ挿入後、10 分時点で実施してください。
- ・ テストストリップを扱う際は、手袋等を着用し、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。テストストリップの試料添加部や検出部には直接手を触れることがないように十分注意してください。
- ・ テストストリップをチューブに挿入する際、テストストリップの試料添加部が 0.2 mL チューブの底に当たるまで十分に挿入してください。
- ・ テストストリップを挿入する際は、反応液の飛散による汚染に十分にご注意ください。

■ 結果判定

下記の判定基準に従って、結果判定を行う。



判定結果例

- パターン A : サルモネラ不検出
- パターン B : O4 群、O7 群、O9 群に属さないサルモネラを検出
- パターン C : O4 群に属するサルモネラを検出
- パターン D : O7 群に属するサルモネラを検出
- パターン E : O9 群に属するサルモネラを検出
- パターン F~H(一例) : 判定不能(要再試験)

【注意事項】

- ・ コントロールラインは、増幅反応が正常に進行している場合に常時着色します。コントロールラインが着色しない場合は、増幅反応が正常に進行していない可能性があるため、再試験を実施してください。
- ・ 各検出ラインは陽性の場合のみ着色します。ただし、O4 群、O7 群、O9 群検出ラインが着色する場合はサルモネラ検出ラインも着色します。O4 群、O7 群、O9 群検出ラインが着色し、サルモネラ検出ラインが着色しない場合は判定不能となるため、再試験を実施してください(同じ DNA 抽出液を使用し、再試験してください)。

本品使用上の注意事項

<コンタミネーション対策>

- コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、使用したマイクロピペット用チップは1回毎に交換してください。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを使用してください。
- DNA 抽出、PCR 反応液の調製、テストストリップによる検出の各ステップは、別々の実験室で実施することを推奨しております。別々の実験室での実施が難しい場合、同一実験室内で作業台を分離する、または、作業エリアを分離してください。
- 試薬や抽出 DNA 等チューブを開ける前に、低速遠心機等でスピンドウンを行ってください。(内容物の飛散や、蓋に付いた試薬等が手指に付着するのを避けるため)
- マイクロピペット等、使用する器具・装置等は、定期的に0.1%次亜塩素酸ナトリウムや市販の DNA 除去剤等で洗浄してください。
- コンタミネーション(検出対象非存在化で陽性判定)が発生した場合には、0.55%次亜塩素酸ナトリウム(または市販の DNA 除去剤)または UV 等で DNA を除染してください。

<廃棄上の注意>

- 使用後のテストストリップならびに増幅反応液を廃棄する際には、検出部および反応液等に触れないように注意し、ビニール等に入れて廃棄してください。
- DNA 抽出後の試料を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規程、および当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し、廃棄してください。

<性能>

- サルモネラの菌株より抽出したゲノム DNA (5 pg/test 以上)に対して、本取扱説明書に記載された方法に従って検出を行った場合、正常な判定結果を得ることができます。
- 本品の使用は Life ECO Thermal Cycler (Bioer Technology 社製)で使用することを推奨しております。使用するサーマルサイクラーによっては本品の検出感度が異なる場合があります。
- DNA 抽出方法によっては検出感度が異なる可能性があります。
- DNA 抽出後の DNA 量が極めて多い場合や培養液の持込み量が多い場合には、PCR 増幅反応が阻害されて各検出ラインおよびコントロールラインが共に検出されない可能性があります。その場合、DNA 抽出液を希釈して PCR に供することで改善されることがあります。

保証

- 弊社の責任の範囲は、本品自体に不具合があった場合の代替品への交換のみに限られ、直接・間接を問わずその他一切の損害について弊社はその責任を負いません。あらかじめご了承のうえ、本品を使用してください。

お問い合わせ先

株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle
〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8
TEL: 079-445-2406、FAX: 079-445-2459
お問い合わせ受付時間: 平日 9:00~17:00
URL <http://www.kaneka-labtest.com>