

肉エキス	1 g
ペプトン	10 g
NaCl	75 g
マンニット	10 g
カンテン	15 g
フェノールレッド (0.2%溶液)	12 ml
精製水 (最終)	850 ml
pH 7.4 ± 0.2	

市販品 ニッスイ、栄研など

### 3-2 培地調製

基礎培地を 121°C15 分間オートクレーブした後、卵黄液 (2-3) を 150 ml 加えて混合、シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。市販の 30%卵黄液を用いる時は基礎培地量を 900 ml とし、卵黄液 100 ml を添加する。

市販生培地の使用を可とする。

### 4. コアグラージェ試験用ウサギ血漿

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。あるいは新鮮ウサギ血漿を 3 倍量の滅菌精製水を用いて希釈したものをを用いてもよいが、凝固防止剤にクエン酸塩を用いた場合は EDTA を 0.1%加えて使用する。

## 1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理した試料を、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18 時間培養後、上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18 時間培養する。出現した培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定する。

なお、市販のアルカリペプトン水に塩化ナトリウムを最終濃度 2% になるように加えたものを使用してもよい。

## 2. 同定

腸炎ビブリオと推定される集落については普通寒天斜面、TSI 寒天、LIM 培地に接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間培養後、TSI 寒天および LIM 培地の性状が表 1 に一致した場合は、更に耐塩性試験、VP 試験およびオキシダーゼ試験を行う。表 1 に示した性状と一致したものを腸炎ビブリオと同定する。

### ① 普通寒天斜面培地

普通寒天斜面培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2% になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間培養する。

#### 普通寒天斜面培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	5g	塩化ナトリウム	20g
ペプトン	10g	寒天	15g
		pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の普通寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2% になるように加えたものを使用してもよい。

### ② TSI 寒天による試験

TSI 寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2% になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 18~24 時間培養後、斜面部の黄変により乳糖及び白糖の分解性を、高層部の黄変によりブドウ糖の分解性を、高層部の黒変により硫化水素の産生性を、高層部の気泡又は亀裂によりガス産生性を確認する。

#### TSI 寒天培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	3g	クエン酸鉄アンモニウム	0.2g
酵母エキス	3g	チオ硫酸ナトリウム	0.2g
ペプトン	20g	フェノールレッド	24mg
乳糖	10g	寒天	12g
白糖	10g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	1g		
塩化ナトリウム	20g	pH	7.3

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の TSI 寒天に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

#### ③ LIM 培地による試験

LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を高層部に穿刺し、35±1℃で 18~24 時間培養後、培地の色が濃い紫色になったものをリジン陽性とする。また、高層部に菌が発育し混濁の認められたものを、運動性陽性とする。さらに、インドール試薬を加えて 5 分以内に赤色したものを陽性とする。

#### LIM 培地 (2%NaCl 加)

ペプトン	10g	塩化ナトリウム	20g
酵母エキス	3g	プロムクレゾールブルー	20mg
ブドウ糖	1g	寒天	3g
L-リジン塩酸塩	10g	精製水	1,000ml
L-トリプトファン	0.5g	pH	6.7

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、高層培地とする。

なお、市販の LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

インドール試薬には、Kovac 法と Ehrlich 法があるが、どちらを使用しても差し支えない。Kovac 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 5g を 50℃の水浴中でアミルアルコール 75ml に溶かし、冷やしてから濃塩酸 25ml を加えて作り、遮光して 4℃に保存する。Ehrlich 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1g をエタノール 95ml に溶かし、これに濃塩酸 20ml を加えて作る。

#### ④ 耐塩性試験

Nutrient Broth (Difco, Merck, BBL: 肉エキス 0.3%、ペプトン 0.5%) 又は Lab-Lemco Broth (Oxoid) に塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および 8%加えたものに、腸炎ビブリオと

推定される菌を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18時間培養し、明瞭な増殖による培地の濁りを確認する。

また、上記 Broth 以外にペプトン水又はトリプトン水 (pH7.2) に、塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および 8%加えたものを使用しても差し支えないが、使用にあたっては腸炎ビブリオ標準菌株を用い、0%で発育しないこと、8%で発育することを確認した後、使用すること。

なお、本試験に際して接種する菌は、普通寒天培地の菌を用い、接種菌量は希釈により濁りが目に見えない程度の少菌量を接種すること。

#### ⑤ Voges-Proskauer (VP) 試験

VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で18~24時間培養後、その上層部に 6%  $\alpha$ -ナフトール・アルコール液 0.2ml 及び 0.3%クレアチン加 40%水酸化カリウム水溶液 0.1ml を加え、1時間以内に赤色あるいは深紅色となったものを陽性とする。

##### VP 半流動培地 (2%NaCl 加)

酵母エキス	1g	塩化ナトリウム	20g
カゼインペプトン	7g	寒天	3g
ソイペプトン	5g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	10g	pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧蒸気滅菌を行う。

なお、市販の VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

#### ⑥ チトクローム・オキシダーゼ試験

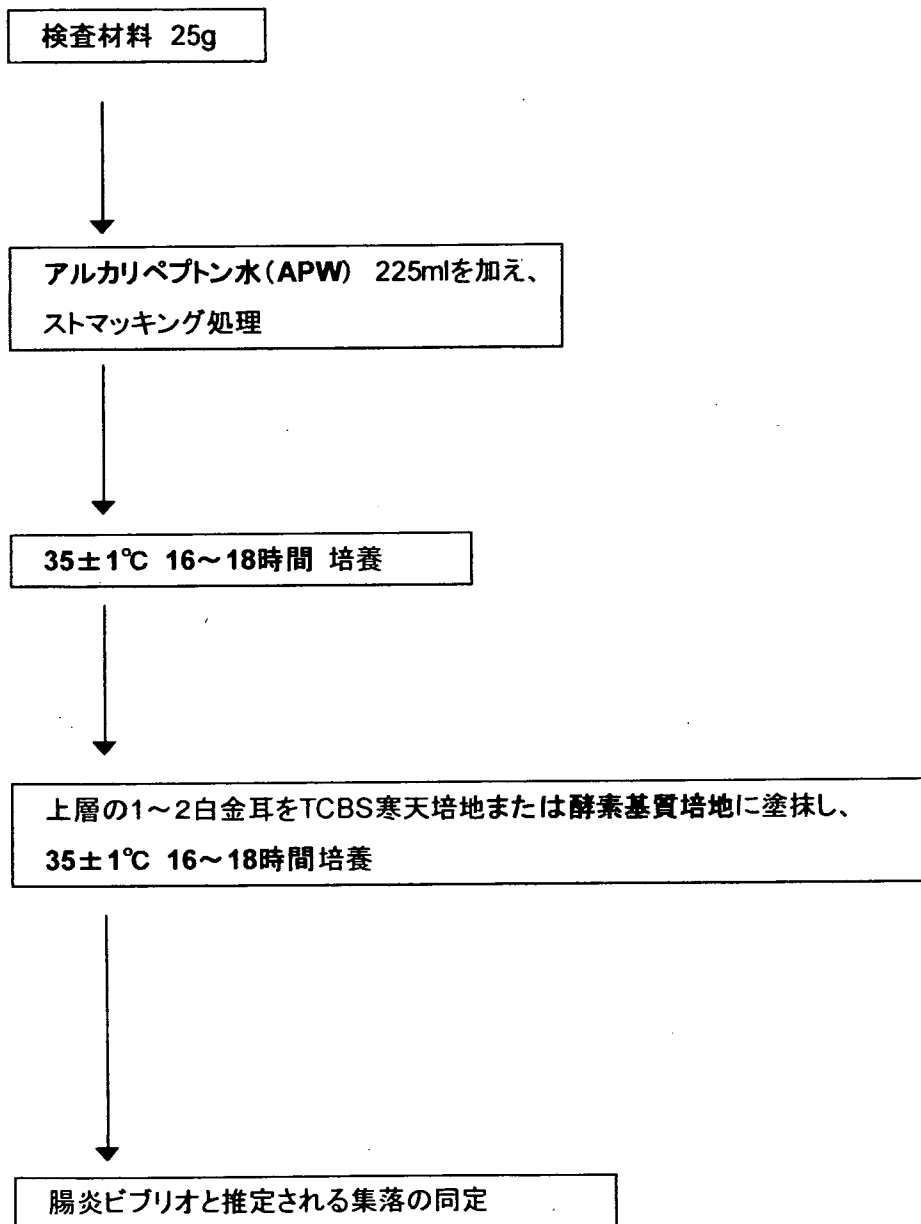
1 w/v %テトラメチル *p*-フェニルジアミン蒸留水液を染みこませたろ紙をシャーレ内に置き、ろ紙に白金耳 (白金製) で普通寒天培地上の菌を塗布する。10 秒以内に紫色に変色すれば陽性である。

なお、市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙を使用してもよい。市販の試験用ろ紙に精製水を数滴滴下し、ろ紙全体を湿らせた後、普通寒天培地上の菌を白金耳で塗布する。

表1 腸炎ビブリオの性状

T S I寒天				L I M培地			発 育		V P	オ キ シ ダ ー ゼ
斜 面	高 層	硫 化 水 素	ガ ス	リ ジ ン	イ ン ド ー ル	運 動 性	O %	8 %		
赤	黄	-	-	+	+	+	-	+	-	+

## 腸炎ビブリオ検査方法・定性法



## 1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理し、検体の 10 倍希釈液を作成し試料とする。次に検体の 10 倍希釈液 1ml を APW 9ml の入った試験管に入れ、検体の 100 倍希釈液を作成する。

検体の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管にそれぞれ 1ml ずつ接種し、また、検体の 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管に 0.1ml ずつ接種する。

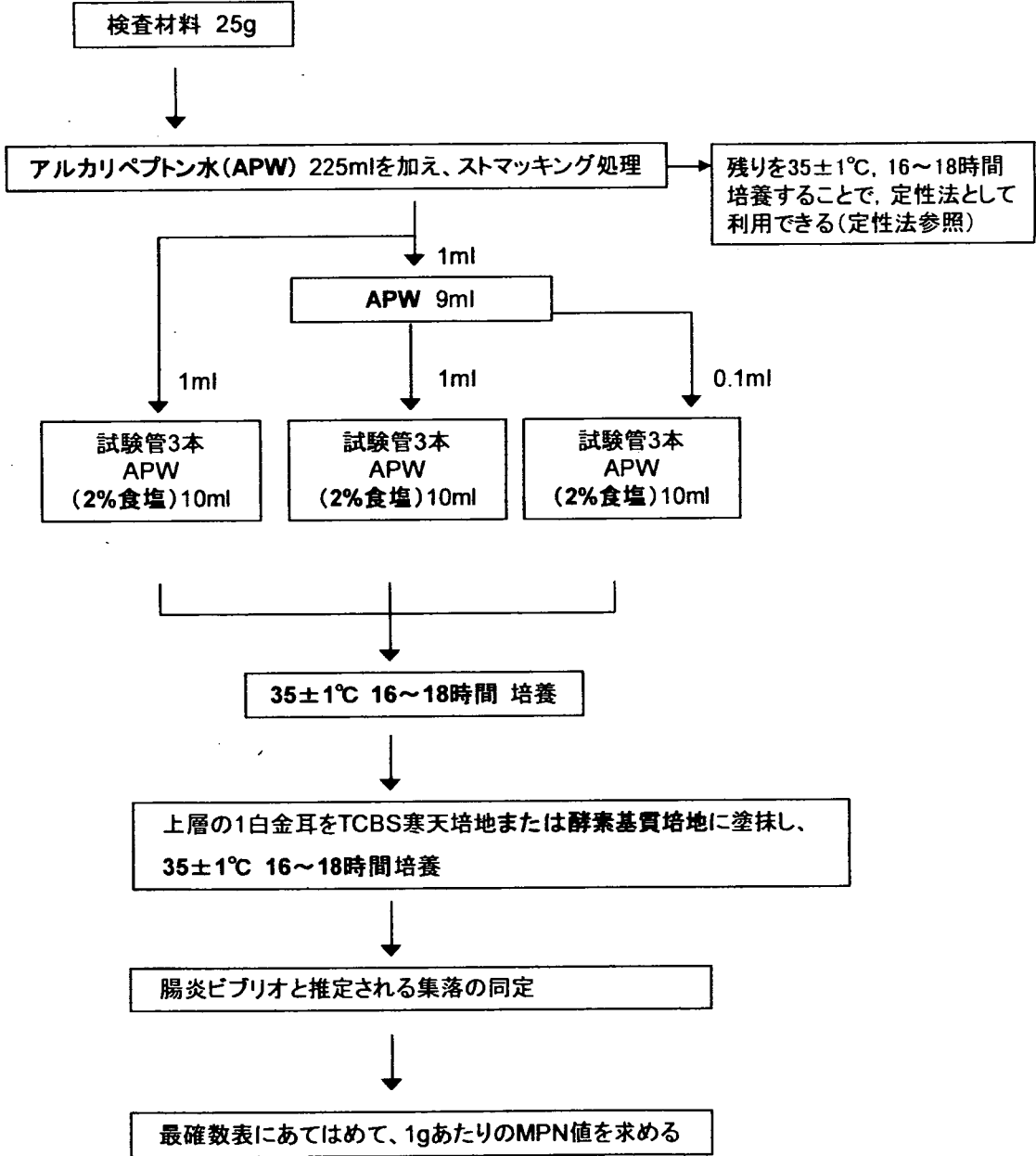
35±1℃、16~18 時間培養後、各試験管の上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、35±1℃、16~18 時間培養する。培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定し、各段階に希釈した試験管の陽性本数を最確数表にあてはめて、1g あたりの最確数を求める。

25g に APW 225ml を加えた 10 倍乳剤液は、そのまま培養して定性法として利用できる。

## 2. 同定

腸炎ビブリオ試験法・定性法(NIHSJ-06-ST2)に準ずる。

腸炎ビブリオ検査方法・定量法





## 1. サンプルの調製

### (1) サンプルの採取

検体あたり 25 g (25 mL) を採取し、ストマックバッグに入れる。

### (2) サンプルの調製

増菌培地 100 mL を加えてホモジネートする。

増菌培養は通常の場合、Preston 増菌培地を利用する。

また、菌損傷の可能性の高い場合は Bolton 培地を使用する。

## 2. 増菌培養

### (Preston 培地)

微好気条件下にて  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 48 時間培養する。

### (Bolton 培地)

微好気条件下にて  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 4 時間培養の後に、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 44 時間培養する。

尚、温度シフトを行わないで  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養することも可能である。

微好気条件は下記の方法によって設定する。

微好気条件とは酸素 5%、二酸化炭素ガス 10%、チッ素 85%を基本とする。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。
- ② 市販の微好気ジャーシステム（ガスキットシステムなど）を利用する。
- ③ 微好気ガスで容器の気相を置換し、ガスを透過しない容器で密閉する。
- ④ 通気性のない材質の容器または袋を使用し、これに増菌培養液を直接入れた後、上部空隙部分を少なくして密閉する。

## 3. 分離培養

分離培地に増菌培養した液を画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 48 時間培養する。

分離培地は mCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の培地を追加する。

必要に応じ追加する培地: Karmali 寒天培地, Modified Butzler 培地, Skirrow 培地,

Preston 寒天培地

培養液は油層を出来る限り避けて採取し、分離培地に塗抹する。

## 4. 同定

### (1) コロニーの観察および採取

疑わしい形状のコロニーを 5 コロニー程度採取。

直径 1 - 2 mm 程度の正円形でやや隆起したコロニー (時に扁平する) を対象とする。

(2) コロニーの同定準備

血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して 42±1℃にて 24・48 時間培養。

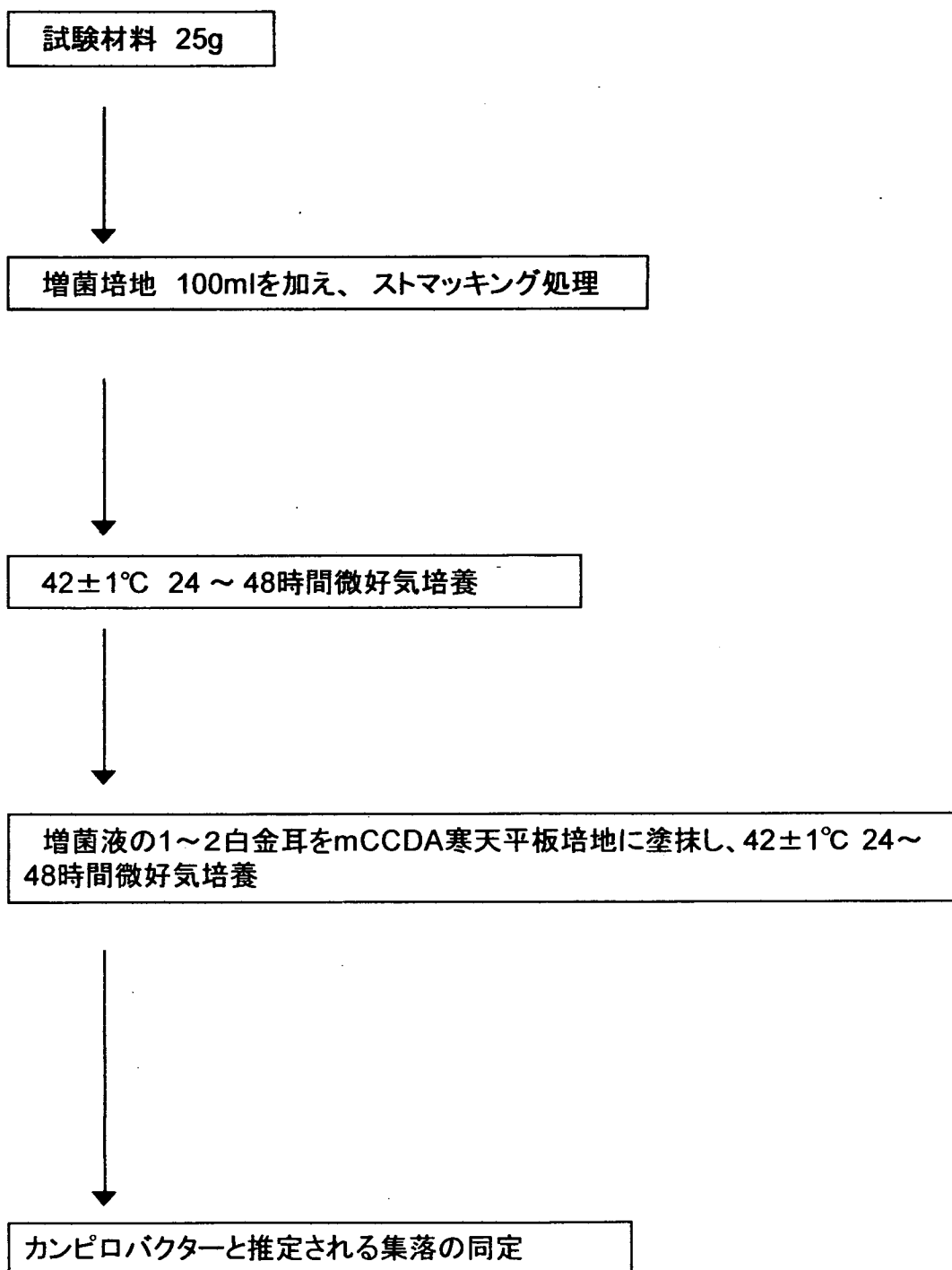
(3) 鑑別同定

- ① グラム染色などによる菌形の確認：ラセン状 (球状 [コッコイド] の場合もある) のグラム陰性かん菌
- ② カタラーゼ陽性
- ③ オキシダーゼ陽性
- ④ ラテックス凝集テスト (DrySpotTest など) で陽性
- ⑤ 必要に応じて TSI 培地などで生化学試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う

- ① 馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [-])
- ② インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [+])
- ③ PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

## カンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の試験法



## 1. サンプルの調製

### (1) サンプルの採取

検体あたり 25 g (25 mL) を採取し、ストマックバッグに入れる。

### (2) サンプルの調製

増菌培地 100 mL を加えてホモジネートする。

増菌培養は通常の場合、Preston 増菌培地を利用する。

また、菌損傷の可能性の高い場合は Bolton 培地を使用する。

## 2. 増菌培養

### (Preston 培地)

微好気条件下にて  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 48 時間培養する。

### (Bolton 培地)

微好気条件下にて  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 4 時間培養の後に、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 44 時間培養する。

尚、温度シフトを行わないで  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養することも可能である。

微好気条件は下記の方法によって設定する。

微好気条件とは酸素 5%、二酸化炭素ガス 10%、チッ素 85%を基本とする。

- ① 培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータを使用する。
- ② 市販の微好気ジャーシステム（ガスキットシステムなど）を利用する。
- ③ 微好気ガスで容器の気相を置換し、ガスを透過しない容器で密閉する。
- ④ 通気性のない材質の容器または袋を使用し、これに増菌培養液を直接入れた後、上部空隙部分を少なくして密閉する。

## 3. 分離培養

分離培地に増菌培養した液を画線塗抹し、 $42 \pm 1^\circ\text{C}$  にて 24 - 48 時間培養する。

分離培地は mCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の培地を追加する。

必要に応じ追加する培地: Karmali 寒天培地, Modified Butzler 培地, Skirrow 培地,

Preston 寒天培地

培養液は油層を出来る限り避けて採取し、分離培地に塗抹する。

## 4. 同定

### (1) コロニーの観察および採取

疑わしい形状のコロニーを 5 コロニー程度採取。

直径 1 - 2 mm 程度の正円形でやや隆起したコロニー（時に扁平する）を対象とする。

(2) コロニーの同定準備

血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して 42±1℃にて 24・48 時間培養。

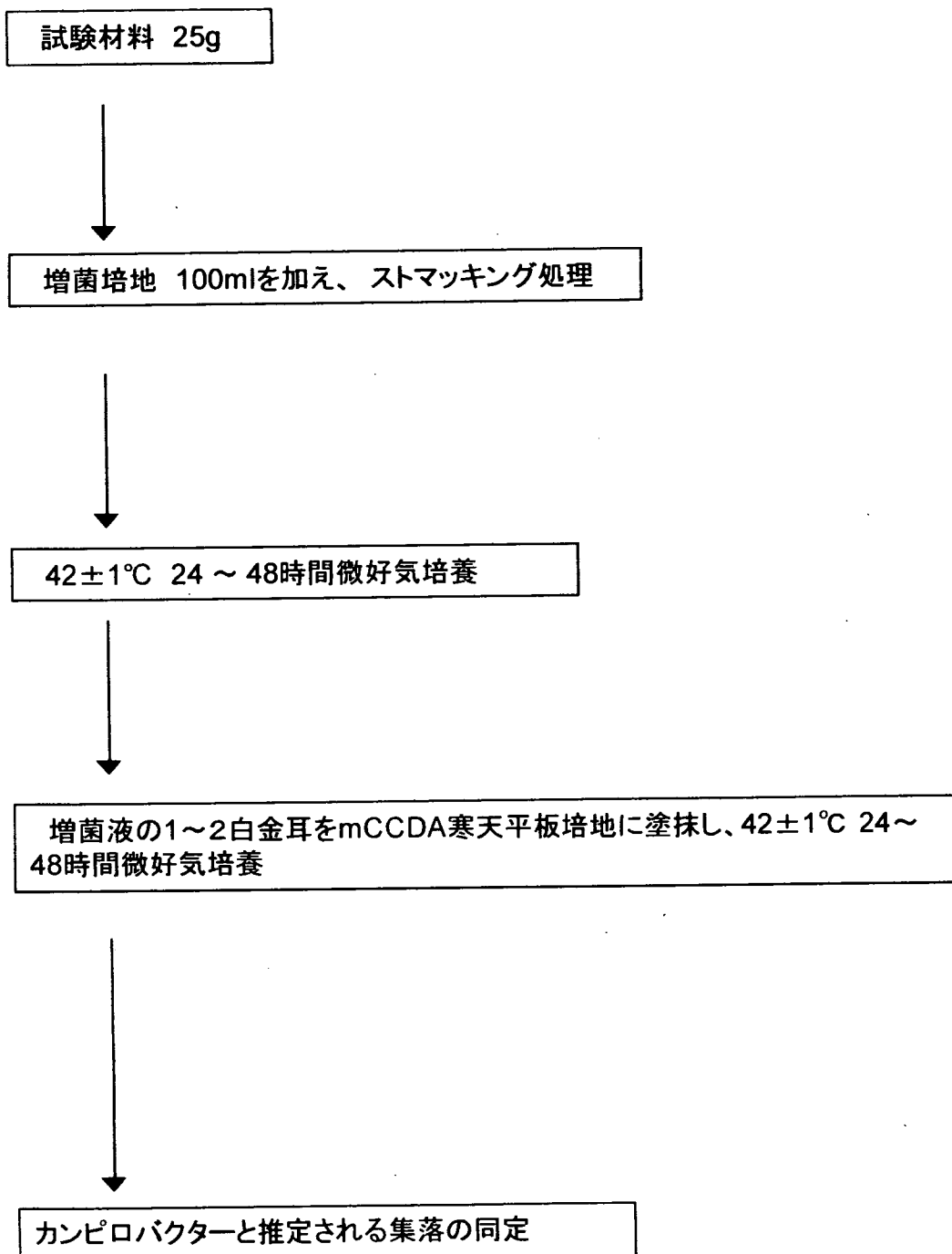
(3) 鑑別同定

- ① グラム染色などによる菌形の確認：ラセン状（球状 [コッコイド] の場合もある）のグラム陰性かん菌
- ② カタラーゼ陽性
- ③ オキシダーゼ陽性
- ④ ラテックス凝集テスト（DrySpotTest など）で陽性
- ⑤ 必要に応じて TSI 培地などで生化学試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う

- ① 馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [-])
- ② インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [+], *C. coli* [+])
- ③ PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

## カンピロバクター(ジェジュニコリ)の試験法



サルモネラ試験法 案

Proposal of the Standard Method for Isolation of  
*Salmonella* in Foods

## サルモネラ属菌標準試験法

1. 試験試料 25 g をストマッキング袋等は無菌的にとりわけ、BPW 225 ml を加え、ストマッカーなどで均質化し、培養する。その培養液の一部を RV 培地と TT 培地で選択増菌培養後、2 種類の分離寒天培地（硫化水素産生性で検出する培地と硫化水素産生性に関係なくサルモネラを検出する培地、それぞれ 1 種類）に塗抹培養し、集落の産生を検討する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI 寒天培地および LIM 培地に接種し、生化学的性状の確認を行う。さらに、抗 O 血清による凝集反応により O 抗原の血清型別を実施してサルモネラ属菌と確定する。

## 2. 使用器具、装置

- ① 滅菌ハサミ
- ② 滅菌ピンセット
- ③ 滅菌装置
- ④ ストマッカー
- ⑤ ストマッキング袋
- ⑥ 三角フラスコ
- ⑦ 自動秤量分注装置または秤量器



- ⑧ pH 計
- ⑨ 滅菌ピペットまたはマイクロピペットと滅菌チップ
- ⑩ メスシリンダー
- ⑪ 小試験管
- ⑫ 中試験管
- ⑬ 試験管立て
- ⑭ 白金耳
- ⑮ 高圧蒸気滅菌器 (滅菌のインジケーター必要)
- ⑯ 乾熱滅菌器 (滅菌のインジケーター)
- ⑰ 恒温槽または恒温水槽 ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$  と  $42.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  の制御)
- ⑱ 滅菌シャーレ

### 3. 培地、試薬および抗血清

- ① 前増菌用培地緩衝ペプトン水 (BPW) : 加温溶解後、 $121^\circ\text{C}$  で  
15 分間滅菌する。

- ② 選択増菌用培地

Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 : 加温溶解後、10ml ずつ中  
試験管に分注し、 $115^\circ\text{C}$ 、15分間滅菌する。作製後は冷蔵庫で数  
週間保存可能。

Tetrathionate (TT) 培地：沸騰まで加温混和後、40℃以下に冷却する。ヨウ素溶液20mlを培地1Lに加え、よく攪拌する。さらに攪拌しながら、10 ml ずつ滅菌中試験管に分注する。TT基礎培地は作製後冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日に使用のこと。

### ③ 分離寒天培地

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB、DHLと XLDから1種類。使用説明書に従って作製。

硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地：BGS(ブリリアントグリーン+スルファピリジン)、CHS(クロモアガーサルモネラ)、ES II (ESサルモネラ寒天培地II) , SMIDIIから1種類。使用説明書に従って作製。

### ④ 確認用培地

TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層斜面とする。

LIM (Lysine Indole Motility) 培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

### ⑤ O血清型確認血清

サルモネラ免疫血清0多価、01多価および0群血清

⑥ 生化学的性状確認培地と試薬等

シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、斜面とする。

VP半流動培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

インドール試薬

VP用試薬

チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙

4. 試験手順

1) 前培養増菌

① BPW を約 35℃となるよう温めておく。

② 試料 25g に BPW 225ml を加え、1 分間ストマッカー処理する。

③ 35±1℃、22±2 時間前増菌培養する。

2) 選択増菌培養

① RV 培地および TT 培地を約 42℃となるように温めておく。

② BPW で前培養した培養液 0.1 ml を RV 培地 10 ml に接種

する。

③ BPW で前培養した培養液 1 ml を TT 培地 10 ml に接種する。

④ 接種した RV および TT 培地を  $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養する。

### 3) 分離用寒天培地

① 培養後の RV および TT 培地をよく攪拌する。

② 1 白金耳量を、以下の (ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地および (イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹する。

(ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

- ① MLCB
- ② DHL
- ③ XLD

(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

- ① BGS (ブリリアントグリーン+スルファピリジン)
- ② CHS (クロモアガーサルモネラ)
- ③ ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)